



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 19/00, 14/745, A61K 47/48, C12P 21/02, C12N 15/12 // (C12P 21/02, C12R 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/29453</p> <p>(43) 国際公開日 1998年7月9日(09.07.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00002</p> <p>(22) 国際出願日 1998年1月5日(05.01.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/359053 1996年12月27日(27.12.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 栗山伸一(KURIYAMA, Shin ichi)(JP/JP) 長谷川敏(HASEGAWA, Takashi)(JP/JP) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 渡辺望徳, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.) 〒101 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号 千代田岩本ビル4階 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: CELL MEMBRANE-DIRECTED DRUGS</p> <p>(54)発明の名称 細胞膜指向性薬剤</p> <p>(57) Abstract Drugs wherein peptides having an affinity specific to phospholipids, preferably those which constitute a lipid bilayer forming a cell cortex and the content of which in the lipid bilayer increases in abnormal cells, for example, injured, denatured or activated cells are bonded to physiologically active substances; deoxyribonucleic acids (DNA) encoding the amino acid sequences of the drugs when the physiologically active substances are peptides; and processes for producing these drugs. These drugs and novel peptides are useful as preventives and remedies for diseases accompanied by blood coagulation disorders, inflammation and immune responses.</p>		

(57) 要約

リン脂質、好ましくは細胞表層を形成する脂質二重層の構成成分に含まれるリン脂質であって、脂質二重層の外層に含まれる割合が細胞が正常でない時に増加するリン脂質、例えば損傷を受けた、変性した、または活性化された時等に増加するリン脂質、に特異的な親和性を有するペプチドと生理活性物質とが結合した薬剤、生理活性物質がペプチドである場合に薬剤のアミノ酸配列をコードするデオキシリボ核酸（DNA）及びこれら薬剤の製造方法を提供し、これらの薬剤及び新規ペプチドは、血液凝固障害、炎症及び免疫応答を伴う疾患の予防及び治療剤として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	NZ	ニュージーランド
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
AT	オーストリア	GB	英国	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	GE	ジョージア	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GU	グアム	ME	モンテネグロ	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	HN	ホンジュラス	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BD	バングラデシュ	HR	クロアチア	MK	マケドニア共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BE	ベルギー	IE	アイルランド	ML	マリ	UA	ウクライナ
BG	ブルガリア	IL	イスラエル	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BH	バーレーン	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	US	米国
BI	ブルンジ	IT	イタリア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
BJ	ベナン	JP	日本	NE	ニジェール	VN	ベトナム
BM	バハマ	KE	ケニア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
BN	ブルネイ	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
BO	ボリビア	KG	キルギス	NZ	ニュージーランド		
BR	ブラジル	KH	カンボジア	PL	ポーランド		
BS	バハマ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
BT	ブータン	KW	クウェート	RO	ルーマニア		
BV	ブーヴィエ	KY	ケイマン諸島	RS	セルビア		
BW	ボツワナ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
BY	ベラルーシ	LA	ラオス	SC	スコットランド		
BZ	ベリーズ	LB	レバノン	SG	シンガポール		
CA	カナダ	LC	セント・ルシア	SI	スロベニア		
CC	ココス（キリング）諸島	LI	リヒテンシュタイン	SK	スロバキア		
CD	コンゴ共和国	LK	スリランカ	SL	シエラ・レオネ		
CF	中央アフリカ共和国	LR	リベリア				
CG	コンゴ共和国	LS	レソト				
CH	スイス						
CI	コートジボワール						
CK	カキマ						
CL	チリ						
CM	カメルーン						
CN	中国						
CO	コロンビア						
CR	コスタリカ						
CU	キューバ						
CV	ケプヴェルデ						
CY	キプロス						
CZ	チェコ						
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						
DM	ドミニカ						
DO	ドミニカ共和国						
EE	エストニア						
EG	エジプト						

明 細 書

細胞膜指向性薬剤

5 技術分野

本発明は、リン脂質、好ましくは細胞表層を形成する脂質二重層の構成成分に含まれるリン脂質であって、脂質二重層の外層に含まれる割合が細胞が正常でない時に増加するリン脂質、例えば損傷を受けた、変性した、または活性化された時等に増加するリン脂質、に特異的な親和性を有するペプチドと生理活性物質と

10 が結合した薬剤、生理活性物質がペプチドである場合に薬剤のアミノ酸配列をコードするデオキシリボ核酸（DNA）及びこれら薬剤の製造方法に関する。

本発明は、また、リン脂質、好ましくは細胞表層を形成する脂質二重層の構成成分に含まれるリン脂質であって、脂質二重層の外層に含まれる割合が細胞が正

15 常でない時、例えば損傷を受けた、変性した、または活性化された時、等に増加するリン脂質、さらに好ましくはホスファチジルセリン若しくはホスファチジルエタノールアミン、より好ましくはホスファチジルセリンに特異的な親和性を有する新規ペプチド及びそのペプチドをコードするDNAに関する。

本発明の薬剤及び新規ペプチドは、血液凝固障害、炎症及び免疫応答を伴う疾

20 患の予防及び治療剤として有用である。

背景技術

今日、有用性の高い薬剤の創出に関わる研究は盛んに行われているが、その一つとして、体内に投与した薬剤の標的作用部位に到達する割合を高めて無効になる量を減らそうとする試みが知られている。これは、薬剤を部位選択的に集積させようとする試み、いわゆるターゲッティングの試みである。この代表的な方法の一つとして抗原抗体反応を利用する方法を挙げることができる。例えばその一例として、アドリアマイシン（ADM）を含有するリボソームに腫瘍細胞特異的な抗体（21B2）のF（ab'）₂断片を結合させたイムノリボソームを作製し、腫瘍細胞へADMを集積させる方法（I. Uyama et al., Jpn. J. Cancer Res., Vol. 85, 434（1994））を挙げることができる。もう一つの代表的な方法は、ポリペプチドからなる受容体とそのリガンドとの結合反応を利用する方法である。その一例として、ホスホオリパーゼA₂（PLA₂）のC末端にGPⅡb/GPⅢa受容体に結合性を有するRGDポリペプチド配列を付与することによって、血小板の膜表面上にPLA₂を集積させる方法（A. C. A. P. A. Bekkers et al., Thrombosis and Haemostasis, Vol. 74, 1138（1995））を挙げることができる。この他の例としては、細胞表面上に存在するヘパリンに対して親和性を有するペプチドをスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）や補体制御因子に結合させて、SODを細胞表面上へ集積させる方法（M. Inoue et al., J. Biol. Chem., Vol. 266, 16409（1991））や、補体制御因子を細胞表面上へ集積させる方法（国際特許出願公開公報WO/96/34965）が報告されている。

る。

- 一方、それ自身は何ら生理活性を有しないが、標的作用部位に選択的に集積することにより、生理活性因子が標的作用部位に結合することを競争反動的に阻害するペプチドが知られている。その一例として、細胞表面上に存在する受容体に
- 5 選択的に結合することによりリガンドが受容体に結合するのを阻害するポリペプチドを挙げることができる。その一例として、抗TNF α モノクローナル抗体の抗原認識部位 (complementary determining region: CDR) 由来のポリペプチド断片が、TNF α が受容体に結合するのを阻害することが挙げられる (E. Doring et al.,
- 10 Molecular Immunology, Vol. 31, 1059 (1994))。他の一例としては、リン脂質であるホスファチジルセリンに選択的に結合することにより血液凝固反応の進展に関与する因子がリン脂質と結合するのを阻害するポリペプチドで、ヒトFactor VIII C2領域末端の30アミノ酸からなるポリペプチド (国際特許出願公開公報WO/90/15615) や、ホ
- 15 スファチジルセリン認識抗体のCDR由来の12アミノ酸からなるポリペプチド (特許出願公開公報特開平5-92992) が挙げられる。

- 有用性の高い薬剤の創出に関する他の例としては、遺伝子工学的手法により、生理活性を有するペプチドに新たな生理活性機能を付与する試みが知られている。
- 例えば血液凝固反応を抑制することが知られているTMでは、組織プラスミノ
- 20 ゲンアクチベーター (tPA) 等のフィブリン溶解酵素をTMペプチドに結合させたTM誘導体 (特許出願公表公報特表平4-505554)、特定のアミノ酸配列をTMペプチドのC末端に結合させてアンチトロンビンⅢの活性を増強する

作用及び血小板凝集抑制作用を付与したTM誘導体（特許出願公開公報特開平6-279497）などの作出が報告されている。

発明の開示

- 5 現在、副作用を有するために、その使用量を制限せざるを得ない薬剤が多数知られている。例えば、抗血液凝固剤としてヘパリンやアンチトロンビンⅢが使用されているが、これらの物質は、出血傾向などの副作用を有するため、その使用を制限せざるを得ない場合がある。

- 薬剤を投与する場合、一般に、一定の効果をを得るために一定量以上の投与が必要となる場合があり、患者にとって副作用が深刻な問題となる場合がある。
- また、薬剤の大量投与は患者の経済的負担を増加させることにつながる場合が少なくない。したがって、薬剤として服用した時の副作用を軽減させることが可能で、かつ、患者の経済的負担を増加させることなくより広範に使用することが可能と期待される、少量でも十分に効果を示す活性の高い薬剤の開発が望まれている。
- 15

- かかる状況において、本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、特定のリン脂質に親和性を有する物質と生理活性物質とを結合させて作出した特定のリン脂質に親和性を有する薬剤は、特定のリン脂質への集積性が向上しその作用効果が著しく高まることを見出した。さらに、この作用効果の著しい高まりが特定のリン脂質に依存することを見出し、本発明を完成した。
- 20

すなわち、本発明第1の態様は、リン脂質に親和性を有する物質と生理活性物質とを含有する薬剤である。該薬剤は、好ましくは所望のリン脂質に親和性を有

- する部分と生理活性を有する部分とを併せ持つ新規な物質を有する薬剤であり、本来天然に存在する形態と異なる意味から、キメラ物質又は異種融合物質を有する薬剤である。ここで、前記リン脂質に対する親和性、若しくはリン脂質に親和性を有する部分は、リン脂質に親和性を有する物質に由来し、生理活性若しくは
- 5 生理活性を有する部分は、生理活性物質に由来することが好ましい。具体的には、特定のリン脂質、好ましくはホスファチジルセリン若しくはホスファチジルエタノールアミン、より好ましくはホスファチジルセリン、に親和性を有する物質と生理活性物質とを含有して成る薬剤である。ここで、特定のリン脂質に親和性を有する物質はペプチド若しくはペプチドを含有するものであることが好ま
- 10 しく、そして該ペプチドは、下記の一般式で表わされる配列を有するもの、好ましくは該配列からなるものである。なお、本明細書に記載の配列は、いずれもその特性を損なわない限り、その構成要件の一部に置換、欠失、付加及び挿入等が行われてもよい。具体的には配列がアミノ酸配列であればその活性を損なわずに
- 1 以上のアミノ酸が置換、欠失、付加及び挿入等がされていてもよい。

$$15 \quad (A1)n_1 - (A2)n_2 - (A3)n_3$$

- (ただし、上記一般式において、A1は配列番号1若しくは配列番号10に記載のアミノ酸配列を示し、A2及びA3はそれぞれ配列番号2及び配列番号3に記載のアミノ酸配列を示し、また、 n_1 、 n_2 及び n_3 はそれぞれA1、A2及びA3の繰返し回数であってそれぞれ0～5、1～5及び0～5であり、好ま
- 20 くは、 n_1 が0若しくは1、 n_2 が1、2若しくは3、 n_3 が0若しくは1である。)

さらに好ましくは、リン脂質に親和性を有する物質が少なくとも下記のいずれ

かの配列を有する。

(A 1)₁ - (A 2)₁ - (A 3)₁ [配列番号 8 若しくは配列番号 9]

(A 2)₁ - (A 3)₁ [配列番号 5]

(A 2)₂ - (A 3)₁ [配列番号 6]

5 (A 2)₃ - (A 3)₁ [配列番号 7]

(A 2)₂ [配列番号 2 2]

- 本発明第 1 の態様の薬剤は、生理活性物質として好ましくはペプチドを、具体的には血液凝固反応系に関与する因子、線溶系に関与する因子、免疫応答反応に関与する因子、細胞障害を抑制する因子、蛋白分解酵素の活性を阻害する因子、
- 10 及びそれらの改変体からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを、より好ましくは血液凝固反応を抑制する因子、線溶系を亢進する因子、補体活性化反応を抑制する因子、活性酸素による細胞障害を抑制する因子、蛋白分解酵素の活性を阻害する因子及びそれらの改変体からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを、さらに好ましくは TM、U T I の第二領域、M C P、U T I 及びそれらの改変体からなる
- 15 群から選ばれる少なくとも 1 つを、特に好ましくは、配列番号 4 若しくは配列番号 2 3 ~ 2 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するペプチドを含有する。

- 本発明第 1 の態様の薬剤は、生理活性物質と特定のリン脂質に親和性を有する物質とを含有する形態において、好ましくはペプチド結合を介する結合を含み、さらに好ましくは、リン脂質に親和性を有する物質の N 末端アミノ酸と生理活性
- 20 物質の C 末端アミノ酸、若しくはリン脂質に親和性を有する物質の C 末端アミノ酸と生理活性物質の N 末端アミノ酸とがペプチド結合を介する結合を含み、より好ましくはリン脂質に親和性を有する物質の N 末端アミノ酸と生理活性物質の C

末端アミノ酸とがペプチド結合を介して結合している形態を含む。

本発明第2の態様は、下記の一般式で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを提供する。

$$(A2)_{n_2} - (A3)_{n_3}$$

- 5 ただし、A2及びA3はそれぞれ配列番号2及び配列番号3に記載のアミノ酸配列であり、 n_2 はA2の繰返し回数であって2若しくは3、 n_3 はA3の繰返し配列であって0若しくは1である。

さらに好ましくは、該ペプチドのアミノ酸配列が下記のいずれかの配列を有する。

10 $(A2)_2 - (A3)_1$ [配列番号6]

$(A2)_3 - (A3)_1$ [配列番号7]

$(A2)_2$ [配列番号22]

本発明第3の態様は、本発明第1の態様の薬剤若しくは該薬剤のペプチド部分のアミノ酸配列をコードするDNAを提供する。

- 15 本発明第4の態様は、本発明第2の態様のペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを提供する。

本発明第5の態様は、本発明第1の態様の薬剤の製造方法を提供する。

図面の簡単な説明

- 20 図1は、本発明のDNAを得るためのPCRに用いたDNAプライマーを示す図面である。

図2は、本発明のDNAを得るためのPCRに用いたDNAプライマーを示す

図面である。

図3は、ヒトTMcDNAのクローニング及びヒトTM発現ベクターの構築過程を示す図面である。

図4は、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTM発現
5 ベクター、ホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTIの第二領域発現ベクター、ホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTI発現ベクター及びホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトMCP発現ベクターを構築する際に用いた合成DNAを示す図面である。

図5は、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTM発現
10 ベクター、ホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTIの第二領域発現ベクター、ホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTI発現ベクター及びホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトMCP発現ベクターを構築する際に用いた合成DNAを示す図面である。

図6は、本発明の発現ベクターpM1350の構築過程を示す図面である。

15 図7は、本発明の発現ベクターpM1357の構築過程を示す図面である。

図8は、本発明の発現ベクターpM1356の構築過程を示す図面である。

図9は、本発明の発現ベクターpM1354の構築過程を示す図面である。

図10は、本発明の発現ベクターpM1355の構築過程を示す図面である。

20 図11は、本発明の各種ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTMと未修飾可溶型ヒトTMとのプロテインC活性化を促進する能力を比較した結果を示す図面である。図の縦軸は、プロテインC活性化促進作用の相対活性を表

す。

図12は、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTM (rsTMC2) のプロテインC活性化を促進する能力が、ホスファチジルセリンに特異的であることを示す図面である。白カラムは未修飾可溶型ヒトTM (rsTM) を示し、黒カラムはホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTM (rsTMC2) を示す。図中、横軸のPC、PA、PE及びPSはリポソームの成分を表し、それぞれホスファチジルコリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジルセリンである。また、Lip o (ー) は、リポソーム非存在の場合を表す。一方、縦軸は、プロテインC活性化促進作用の相対活性を表す。

図13は、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTMのリン脂質に対する結合性がホスファチジルセリンに特異的であることを示す図面である。図中、白カラムは未修飾可溶型ヒトTM (rsTM) を表し、斜線を施したカラム及び黒カラムはホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTM (各々、rsTMTd、rsTMC2) を表す。また、図面の横軸は、ホスファチジルコリンとホスファチジルセリンとから成るリポソーム中のホスファチジルセリン含有率を表記したものであり、縦軸は結合量(吸光度)を示したものである。

図14は、本発明の発現ベクターpM1358の構築過程を示す図面である。

図15は、本発明の発現ベクターpM1213の構築過程を示す図面である。

図 1 6 は、本発明の発現ベクター p M 1 3 8 0 の構築過程を示す図面である。

図 1 7 は、本発明の発現ベクター p M 1 3 7 0 の構築過程を示す図面である。

5 図 1 8 は、本発明の発現ベクター p M 1 3 7 1 の構築過程を示す図面である。

図 1 9 は、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有するヒト U T I と未修飾ヒト U T I との活性酸素産生を抑制する能力を比較した結果を示す図面である。図面の縦軸は活性酸素の産生量（単位時間当りの吸光度の変化率）を示したものである。

図 2 0 は、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有するヒト U T I の第二領域（r R - 0 2 0 C 2，図中：●）と大腸菌で発現させたヒト U T I の第二領域（図中：○）とのプロトロンビナーゼ活性を阻害する能力を比較した結果を示す図面である。図面の横軸は、r R - 0 2 0 C 2 及び大腸菌で発現させたヒト U T I の第二領域の濃度をトリプシン阻害活性単位で表記したものであり、縦軸はプロトロンビナーゼ活性の残存率を示したものである。

図 2 1 は、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有するヒト U T I の第二領域（r R - 0 2 0 C 2）のプロトロンビナーゼ活性を阻害する能力が、ホスファチジルセリンに特異的であることを示す図面である。図中の白カラムは r R - 0 2 0 を、斜線を施したカラムは r R - 0 2 0 C 2 をそれぞれ表す。また、図面の横軸は、ホスファチジルコリンとホスファチジルセリンとから成るリポソーム中のホスファチジルセリン含有率を表記したものであり、縦軸はプロ

トロンビナーゼ活性の阻害率を示したものである。

図 2 2 は、本発明の発現ベクター p M 1 3 9 0 の構築過程を示す図面である。

5 発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を詳細に説明する。

- 本発明の「リン脂質」とは、生理活性物質を特定の部位に集積させるために意図される所望のリン脂質であって、細胞表層を形成する脂質二重層の構成成分に含まれるリン脂質であり、脂質二重層の外層に含まれる割合が、細胞が正常でない時、例えば損傷を受けたり変性したり活性化された時等に増加するリン脂質である。より具体的には、例えば、血液凝固反応が進展している時、炎症若しくは免疫担当細胞による細胞の活性化、障害及び／若しくはアポトーシス等のいわゆる免疫応答反応が進展している時、活性酸素による細胞の障害反応が進展している時若しくは蛋白分解酵素による細胞の活性化及び／若しくは障害反応が進展している時等に増加するリン脂質である。このようなリン脂質の代表的例として、
- 15 ホスファチジルセリン及びホスファチジルエタノールアミン (Alan J. Schroit et al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1071, 313 (1991)) を挙げることができ、また好ましくはホスファチジルセリンである。
- 20 本発明の「親和性を有する」とは、何らかの相互作用をすることを指す。「相互作用」とは、互いに結合すること、複合体を形成すること、互いに分子を認識すること、一定の方向へ移動及び／若しくは集まろうとすること、分子の形状を

変化させること及び互いに反応することが含まれる。また、互いに結合する場合その結合様式に何ら制限はなく、例えば静電的結合及び疎水結合等に代表される非共有結合であってもよいし、ジスルフィド結合、エステル結合、エーテル結合及びペプチド結合等に代表される共有結合であってもよい。

- 5 すなわち、本発明第1の態様は、リン脂質に親和性を有する物質と生理活性物質を含有する物質若しくは組成物、好ましくは薬剤であって、特定のリン脂質が共存する条件下でその作用効果が高まることを特徴とする物質若しくは組成物、好ましくは薬剤である。

- ここで、「リン脂質が共存する条件下」とは、人為的に作り出された環境及び
10 自然環境が含まれる。人為的に作り出された環境とは例えばリン脂質、血液、細胞、生体組織及びそれらの破砕物が試験管内若しくはチューブ内等の容器内に含まれている状態等が含まれ、自然環境とは例えば血管や脳、臓器など生体内のあらゆる部分等が含まれる。

- なお、本発明で言う「ペプチド」はそのアミノ酸配列の長さに何ら制限は
15 なく、アミノ酸数が2のいわゆるジペプチドからアミノ酸数が1,000以上に及ぶポリペプチドまでを包含する。

本発明の、リン脂質に親和性を有する物質とは、特定のリン脂質に親和性を有する限り、その物質を構成する分子、形状に何ら制限はないが、好ましくはペプチドで、さらに好ましくは以下のアミノ酸配列からなるペプチドである。

- 20 $(A1)n_1 - (A2)n_2 - (A3)n_3$

ここで、A1は配列番号1若しくは配列番号10に記載のアミノ酸配列、A2及びA3はそれぞれ配列番号2及び配列番号3に記載のアミノ酸配列である。但

し、A 1 は配列番号 1 のアミノ酸配列の全てを若しくは一部を包含すればよい。
例えば配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を包含すればよいが、好ましくは配列
番号 1 のアミノ酸配列全てがよい。配列番号 2 中の X a a は T h r 若しくは
L e u である。A 3 は配列番号 3 のアミノ酸配列の一部若しくは全てを包含す
5 ばよい。また、 n_1 、 n_2 及び n_3 はそれぞれアミノ酸配列 A 1、A 2 及び A 3
の繰り返し回数を表す任意の数であって、 n_1 は好ましくは 5 以下さらに好まし
くは 0 若しくは 1、 n_2 は好ましくは 1 以上さらに好ましくは 1、2 若しく
は 3、 n_3 は好ましくは 5 以下さらに好ましくは 0 若しくは 1 である。

以上の配列の組合せは、上記ペプチドが特定のリン脂質に対する親和性を有す
10 る限りその組合わせ方法に制限はないが、組合わせの好適例として、配列番号 5
～9 及び配列番号 22 に示したものを挙げることができる。

ただし、前述のアミノ酸配列は例示であり、本発明の特定のリン脂質に親和性
を有するペプチドは、特定のリン脂質に対する親和性を有する限りそのアミノ酸
配列には制限はなく、必要に応じて前述のアミノ酸配列に置換、欠失、挿入や付
15 加等を行うことが可能である。さらに必要に応じて、修飾を施すことも可能であ
る。また、前述のアミノ酸配列とは全く異なるアミノ酸配列のホスファチジルセ
リンに親和性を有するペプチド、例えば、F a c t o r X a 等の血液凝固関連因
子に含まれるホスファチジルセリンに親和性を有する G l a 領域（ γ -カルボキ
シグルタミン酸残基で特徴付けられる領域）由来のペプチド（M a n n K.
20 G. e t a l., B l o o d, V o l. 76, 1 (1990)）、
F a c t o r V 由来のホスファチジルセリンに親和性を有するペプチド
（T h o m a s L. O. e t a l., J. B i o l. C h e m.,

Vol. 267, 4189 (1992))、Annexin V由来のホスファチジルセリンに親和性を有するペプチド (M. A. Swairjo et al., Nature Struct. Biol., Vol. 2, 968 (1995)) 等またはそれらの誘導体であってもよい。

- 5 本発明の薬剤において「生理活性物質」とは、生体内で薬理作用を示すものであればいずれでもよく、例えば、生理活性を有するペプチド、薬理作用を示す化学物質及びそれらの集合体及び封入体等が含まれ、好ましくはペプチドである。ここで、「生理活性を有するペプチド」とは生体反応に関与するペプチドであればいずれのペプチドであってもよく、さらに必要に応じて修飾を施すことも可能
- 10 である。好ましくは本来それ自体が細胞膜と何らかの相互作用をしているペプチド若しくは細胞内、細胞膜上、細胞表層及びその周囲に存在する物質と相互作用するペプチドで、その改変体、変異体や誘導体も含まれる。また、本来、非水溶性のペプチド、例えば一部の膜タンパク質、である場合は、必要に応じて水溶性となるように改変されたペプチドであってもよい。この好適な例として、例
- 15 えば、血液凝固反応系に関与する因子、線溶系に関与する因子、免疫応答に関与する因子、細胞障害を抑制する因子及び蛋白分解酵素の活性を阻害する因子等が挙げられ、より好ましくは血液凝固反応を抑制する因子、線溶系を亢進する因子、補体活性反応を抑制する因子、活性酸素による細胞障害を抑制する因子及び蛋白分解酵素の活性を阻害する因子等が挙げられる。さらに詳しく例示す
- 20 ると、血液凝固反応系に関与する因子及び／または血液凝固反応を抑制する因子としては、TM、UTIの第二領域、アンチトロンビンⅢ (ATⅢ)、Tissue Factor Pathway Inhibitor (TF

- P I) 等並びにこれらの改変体、変異体及び誘導体が含まれる。線溶系に関与する因子及び／若しくは線溶系を亢進する因子としては、t P A、ウロキナーゼ (U K) 等、及びこれらの改変体、変異体及び誘導体が含まれる。免疫応答反応に関与する因子としては補体活性化反応を抑制する因子である M C P 及び
- 5 Decay-Accelerating Factor (D A F) 等の補体制御因子等、免疫担当細胞由来の蛋白分解酵素を阻害する U T I 及び U T I の第二領域等並びにこれらの改変体、変異体及び誘導体が含まれる。活性酸素による細胞障害を抑制する因子及び／若しくは蛋白分解酵素の活性を阻害する因子としては、U T I、U T I の第二領域、E l a f i n、S e c r e t o r y
- 10 L e u k o p r o t e a s e I n h i b i t o r (S L P I) 等並びにこれらの改変体、変異体及び誘導体を挙げることができる。また、活性酸素による細胞障害を抑制する因子には S O D 及びカタラーゼ等並びにこれらの改変体、変異体及び誘導体の活性酸素消去作用を有する因子も含まれる。これらの好適例においてさらに好ましくは、T M、U T I の第二領域、M C P、U T I 並びにそれらの
- 15 改変体、変異体及び誘導体、特に配列番号 4 若しくは配列番号 2 3 ~ 2 5 で表されるペプチドが好ましい。これらは例示であり、本発明の生理活性物質を何ら限定するものではない。

- 本発明の第 1 の態様の薬剤において「薬理作用を示す化学物質」とは、生理活性を有するペプチド以外の薬理作用を示す物質全ての中から選ばれる物質であ
- 20 て、生体内で薬理作用を示す限り表記される分子式による制限はない。具体的には、人工的に合成した化合物、天然物及び微生物産生物質より分離して得た化学物質、核酸、糖及び脂質等が含まれ、それらの修飾物も含まれる。さらに詳しく

は、免疫抑制物質であるシクロフォスファミド、抗癌剤であるアクチノマイシシン D、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ヒアルロン酸、レシチン等を挙げることができるが、これらは単に一例であって、本発明の生理活性物質を限定するものではない。

- 5 生理活性を有する物質若しくは薬理作用を示す化合物の「集合体」とは、化学結合や物理的接着等によって、生理活性を有する物質若しくは薬理作用を示す化合物が一定量以上集積した状態にある物を含み、生理活性を有する物質若しくは薬理作用を示す化合物の「封入体」とは、リボソーム、マイクロカプセル若しくは高分子マトリックス内等に生理活性を有する物質若しくは薬理作用を示す化合物が包含されている状態にあるものを含む。

- 本発明薬剤第 1 の態様の、リン脂質に親和性を有する物質と生理活性物質が含まれる形態は、特に限定されることはない。好ましくは、リン脂質に親和性を有する物質が有する特定のリン脂質に対する親和性と、生理活性物質の活性とがいずれも完全には損なわれることなく、リン脂質に親和性を有する物質と生理活性物質とが実質的に一体となって本発明の薬剤を形成している形態を指す。
- 15 また、リン脂質に親和性を有する物質が有する特定のリン脂質に対する親和性と、生理活性物質の活性とがいずれも完全には損なわれることなく、リン脂質に親和性を有する物質と生理活性物質とが実質的に一体となって本発明の薬剤を形成している限り、混合物、組成物、複合体及び結合体等いずれの形態も含まれる。
- 20 すなわち、両者が単に混合している状態であってもよいし、両者を含む組成物であってもよい若しくは両者が互いに相互作用していてもよい。「相互作用」とは、互いに結合すること、複合体を形成すること、互いに分子を認識す

- ること、一定の方向へ移動及び／若しくは集まろうとすること、分子の形状を変化させること及び互いに反応することが含まれ、いずれかの形で直接若しくは間接的に結合していることが好ましい。また、互いに結合する場合その結合様式に何ら制限はなく、例えば静電的結合及び疎水結合等に代表される非共有結合
- 5 であってもよいし、ジスルフィド結合、エステル結合、エーテル結合及びペプチド結合等に代表される共有結合であってもよい。必要に応じて任意のアミノ酸配列を有するペプチド若しくは任意の化合物等の適当なリンカー及びアダプター、例えばビオチンとアビジンによる結合、抗体と抗原による結合若しくは受容体とそのリガンドによる結合等を介してもよく、さらに必要に応じて修飾が施されて
- 10 いてもよい。生理活性物質とリン脂質に親和性を有する物質の少なくとも一方がペプチドの場合は、該ペプチドにおける結合部位としては、N末端、C末端、側鎖に存在するアミノ基、カルボキシル基及びシステイン残基のチオール基等が含まれ、好ましくはN末端若しくはC末端である。特に、生理活性物質とリン脂質に親和性を有する物質の両者がペプチドである場合はペプチド結合を介する結合
- 15 を含むことが好ましく、さらに生理活性物質とリン脂質に親和性を有する物質のいずれか一方のN末端と他方のC末端とがペプチド結合を介して結合している形態が好ましい。すなわち、キメラタンパク質、融合蛋白質などが例示される。この中でもリン脂質に親和性を有する物質のN末端と生理活性物質C末端がペプチド結合したものがより好ましい。これらの具体的な好ましい一例として、配列番
- 20 号4若しくは配列番号23～25から選ばれるアミノ酸配列のC末端に配列番号5～9若しくは配列番号22から選ばれるアミノ酸配列が連結したアミノ酸配列からなるペプチドを含有する本発明の薬剤を挙げることができる。

- 本発明は、また、配列番号 6、7 及び 22 のアミノ酸配列からなる若しくは該配列を含むホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチド及び当該ペプチドを成分として含有する医薬品を提供する。当該医薬品は、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチドが、生理活性物質、その集合体若しくはその封入体と混合若しくは結合したものが含まれる。このホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチドが混合若しくは結合した生理活性物質、その集合体若しくはその封入体は正常でない細胞、例えば損傷を受けたり変性したり活性化された細胞の表面に選択的に集積する性質を有する。すなわち、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチドが必要に応じて適当なリンカーを介して結合した生理活性物質は正常でない細胞、例えば損傷を受けたり変性したり活性化された細胞の表面に選択的に集積する性質を有する。同様に、生理活性物質を含む封入体の骨格を構成する成分に親和性を有する物質で修飾した本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチドを、生理活性物質を含む封入体と、混合若しくは反応して得られるホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチドが表面に結合した生理活性物質を含む封入体は、正常でない細胞、例えば損傷を受けたり変性したり活性化された細胞の表面に選択的に集積する性質を有する。例示すると、生理活性物質がリボソーム内に含まれている場合、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチドをホスファチジルエタノールアミン等の適当なリン脂質で修飾した後、リボソームと混合することにより得られる本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチドがリボソーム表層に結合した薬剤は、損傷を受けたり変性したり活性化された細胞等の正常でない細胞の表面に選択的に集積する性質を有する。

一方、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチドは、血液凝固反応の進展に関与する生理活性因子が標的作用部位に結合することを競争反的に阻害する薬剤として使用することも可能である。

本発明のDNAは、実質的に本発明の薬剤を構成するリン脂質に親和性を有する物質及び／若しくは生理活性物質のペプチドをコードする塩基配列を有するものであればいずれでもよい。より具体的には、本発明は、以下の配列を含有する、好ましくは該配列から成るDNAである。

$$(J1) - (D1)m_1 - (D2)m_2 - (D3)m_3 - (J1)$$

ここで、J1は生理活性を有するペプチドのアミノ酸配列をコードするDNA配列で、5'末端若しくは3'末端の少なくともいずれか一方があればよい。また、D1、D2及びD3はそれぞれA1、A2及びA3で表されるペプチドをコードするDNA配列で、D1は配列番号11若しくは配列番号12、D2は配列番号13若しくは配列番号14、D3は配列番号15に記載のDNA配列である。但し、D1は配列番号11のDNA配列の翻訳枠が変化しない範囲でその全てを若しくは一部を包含すればよい。例えば配列番号12のDNA配列を包含すればよいが、好ましくは配列番号11のDNA配列全てがよい。配列番号13及び14中のMはA若しくはCを表す。D3は配列番号15のDNA配列の翻訳枠が変化しない範囲でその一部若しくは全てを包含すればよい。また、 m_1 、 m_2 及び m_3 はそれぞれDNA配列D1、D2及びD3の繰返し回数を表す任意の数であって、 m_1 は好ましくは5以下さらに好ましくは0若しくは1、 m_2 は好ましくは1以上さらに好ましくは1、2若しくは3、 m_3 は好ましくは5以下さらに好ましくは0若しくは1である。以上の配列の組合せは、上

- 記DNAから翻訳されるアミノ酸配列から成るペプチドが本発明の薬剤である限りその組合わせ方法に制限はない。好適な例として、J 1は例えば血液凝固反応系に関与する因子、線溶系に関与する因子、免疫応答に関与する因子、細胞障害を抑制する因子及び蛋白分解酵素の活性を阻害する因子等のアミノ酸配列をコードするDNAが挙げられ、より好ましくは血液凝固反応を抑制する因子、線溶系を亢進する因子、補体活性化反応を抑制する因子、活性酸素による細胞障害を抑制する因子及び蛋白分解酵素の活性を阻害する因子等のアミノ酸配列をコードするDNAが挙げられる。さらに詳しく例示すると、血液凝固反応系に関与する因子及び／または血液凝固反応を抑制する因子としては、TM、UTIの第二
- 10 領域、ATIII、TFPI等並びにこれらの改変体、変異体及び誘導体が含まれる。線溶系に関与する因子または線溶系を亢進する因子としては、tPA、UK等並びにこれらの改変体、変異体及び誘導体が含まれる。免疫応答反応に関与する因子としては補体活性化反応を抑制する因子であるMCP及びDAF等の補体制御因子等、免疫担当細胞由来の蛋白分解酵素を阻害するUTI、UTIの
- 15 第二領域等並びにこれらの改変体、変異体及び誘導体等が含まれる。活性酸素による細胞障害を抑制する因子及び／または蛋白分解酵素の活性を阻害する因子としては、UTI、UTIの第二領域、SLPI等並びにこれらの改変体、変異体及び誘導体を挙げる事ができる。また、活性酸素による細胞障害を抑制する因子にはSOD及びカタラーゼ等並びにこれらの改変体、変異体及び誘導体の活性
- 20 酸素消去作用を有する因子も含まれる。より好ましい組合わせの代表例としては、配列番号21若しくは配列番号27～29のヌクレオチド配列の3'側に配列番号16～20若しくは配列番号26のヌクレオチド配列が連結したヌクレ

オチド配列からなるDNA配列を挙げることができる。

また、本発明第4の態様のホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAの好適な例は、配列番号17、18及び26のDNA配列（それぞれ配列番号6、7及び22のペプチドをコードする）である。

本発明は、また、本発明のDNAを含む組換えDNA、例えばプラスミド、発現ベクターを提供する。

周知のように、遺伝暗号の縮重に従い、遺伝子からコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくその遺伝子配列の少なくとも一つの塩基を他の塩基に置換することができる。したがって、本発明のDNAは、遺伝子コードの縮重に基づき、塩基配列の一個以上の塩基が置換された塩基配列を有していてもよい。特に、本発明のペプチドを遺伝子工学の手法を用いて製造する際に、特定の宿主細胞で使用頻度の高いコドンとなるように一個以上の塩基を置換した塩基配列を有していてもよい。なお、本発明においては、DNAの塩基配列は5'末端側から記載した。また、本発明においてA、G、C及びTは、デオキシアデニル酸、デオキシグアニル酸、デオキシシチジル酸及びチミジル酸をそれぞれ表す。

本発明の薬剤は、特定のリン脂質に親和性を有する物質と生理活性物質とを個々に作製した後、両者を混合あるいは結合させて得ることができる。ここで、特定のリン脂質に親和性を有する物質と生理活性物質とを混合あるいは結合させる方法は、特定のリン脂質に親和性を有する物質が有する特定のリン脂質に対する親和性と、生理活性物質の活性とがいずれも完全には損なわれることな

く、特定のリン脂質に親和性を有する物質と生理活性物質とが実質的に一体となって本発明の薬剤を形成している限りどのような方法であってもよい。

本発明の特定のリン脂質に親和性を有する物質は、好ましくはペプチドであり、下記より選ばれる少なくとも一つの工程を行うことを特徴とする方法

5 によって得ることができる。

a) 当該ペプチドを化学合成して得る工程

b) 当該ペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを得る工程

c) ベクターに当該DNAを組み入れて、当該DNAを含む複製可能な組換えD

10 NAを得る工程

d) 当該組換えDNAで宿主細胞を形質転換させて、当該ペプチドを発現し得る形質転換体を得る工程

e) 該形質転換体を培養して、当該ペプチドを産生せしめ、培養混合物から当該ペプチドを回収する工程

15 本発明のアミノ酸配列を有するペプチドを化学合成して得る方法は、例えば、自動ペプチド合成機を用いて合成することにより得ることができる。

本発明のペプチドをコードする塩基配列を有するDNAは、例えば以下の如く調製される。なお、特に明記しない限り、一般的な遺伝子工学の手法は、成書（例えば、Molecular Cloning, a laboratory
20 manual, Second edition, T. maniatitis
et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)）に記載された方法に基づいて実施することが可

能である。まず、ヒト細胞やヒト臓器より抽出したmRNAをもとに作製したcDNA、若しくは市販のヒトcDNAライブラリーやヒト染色体DNAを鋳型DNAとする。次いで、既知の遺伝子（例えば、ヒトFactorⅧ遺伝子）の塩基配列を参照し、自動DNA合成機で化学合成したDNAプローブを用いて鋳型DNAをスクリーニングし、所望のポリペプチドをコードするDNAを得る。

特定のリン脂質に親和性を有するポリペプチドをコードするDNAは、また、自動DNA合成機を用いた化学合成のみで得ることも可能である。特定のリン脂質に親和性を有するペプチドをコードするDNAを得るための他の好ましい方法の一例は、Polymerase Chain Reaction（以下PCRと記載する）を利用する方法である。すなわち、既知の遺伝子（例えば、ヒトFactorⅧ遺伝子）の塩基配列を参照し、必要に応じて塩基配列や制限酵素認識部位を付加したDNAプライマーを化学合成し、前述のcDNAを鋳型DNAとしてPCRを行い、所望のDNAを得ることができる。なお、PCRは成書（例えば、PCR Protocols, A Guide to methods and applications, Michael A. I. et al., Academic Press（1990））を参考として行うことができる。

当該DNAをベクターに組入れる工程は、前述の成書に記載された遺伝子工学の一般的な手法に準じて実施することができる。すなわち、ベクターのクローニングサイトを適当な制限酵素で消化し、そこへ必要に応じて制限酵素で消化した当該DNAを、必要に応じてリンカー等を用いて挿入すればよい。また、ここで使用するベクターとしては、使用する宿主内で複製可能なベクターであればよい。

- れでも良いが、好ましくは、当該ペプチドを宿主内で発現させるために必要なプロモーター、リボソーム結合部位、シグナルペプチドをコードするDNA及び／若しくはポリA付加シグナルを含有し、使用する宿主内で複製可能なベクターを選択する。使用するプロモーター、リボソーム結合部位、シグナルペプチド
- 5 をコードするDNA及びポリA付加シグナルは、使用する宿主内で機能するすべてのプロモーター、リボソーム結合部位、シグナルペプチドをコードするDNA及びポリA付加シグナルが使用可能であり、これらは化学的に合成する若しくは任意の細胞、使用する宿主、ウイルス、プラスミド若しくはファージ等から入手することが可能である。
- 10 得られた組換えDNAを宿主細胞に導入する工程は、成書（例えば、「新細胞工学実験プロトコル」（東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社、1991年）に記載された当該分野で一般的な方法、例えばコンピテントセル法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法若しくはエレクトロポレーション法等に準じて実施することができる。得られた組換えDNAを導入する宿主細胞は、
- 15 HeLa細胞、COS細胞、CHO細胞、酵母及び昆虫細胞等に代表される真核生物細胞であっても、また、大腸菌及び枯草菌等に代表される原核生物細胞であってもよく、本発明のペプチドの発現に適した細胞を適宜選択して使用することができる。また、宿主細胞とベクターは、互いに機能し合い、当該ペプチドをコードするDNAを発現し得る組み合わせで使用するのが有用である。例
- 20 えば、ベクターと宿主の組み合わせの好ましい例としては、COS細胞若しくはCHO細胞とシミアンウイルス40（SV40）の初期プロモーターを含有するベクター、EF-1 α プロモーター（EFプロモーター）を含有するベクター若

しくはSR α プロモーターを含有するベクター等、酵母サッカロミセスセレビシエと3-ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子のプロモーターを含有するベクター等若しくは大腸菌HB101と大腸菌由来トリプトファンプロモーターを含有するベクター等の組み合わせがあげられる。

- 5 発現用ベクターで形質転換された宿主は、微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞を培養する公知の一般的方法に準じて栄養培地を用いて培養することができる。形質転換された宿主によって生産される当該ペプチドは、多くの文献や成書（例えば、「新生化学実験講座1タンパク質I」（日本生化学会編、東京化学同人、1990年））に記載された方法を参考にして、培養混合物から精製、単離及び回収することができる。すなわち、脱塩、濃縮、塩析、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過のうちから選ばれる少なくとも一つの方法を用いて当該ペプチドを純粋な形で得ることができる。

- 生理活性を有するペプチドは、前述の特定のリン脂質に親和性を有するペプチドを得る方法と同様にして得ることができる。すなわち、例えばヒトTMを、化学合成によって得ることも、遺伝子工学的手法を用いて得ることも若しくは両者を組み合わせて得ることもできる。

- 薬理作用を示す化学物質は化学合成で得ることができる。また、化学合成で得ることが困難であったり化学合成のための費用が非常にかかる場合には、天然物から抽出、分離及び精製したり、微生物を培養してその培養上清から分離及び精製して得ることも可能である。

本発明の薬剤が、生理活性物質とリン脂質に親和性を有する物質の両者がペプ

チドであって、いずれか一方のN末端と他方のC末端とが、必要に応じて任意の長さのペプチドをリンカーとして介在させて、ペプチド結合により直鎖状に結合している場合は、下記より選ばれる少なくとも一つの工程を行うことを特徴とする方法によって直接得ることができる。

- 5 a) 当該薬剤のアミノ酸配列を有するペプチドを化学合成して得る工程
- b) 当該薬剤のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを得る工程
- c) ベクターに当該DNAを組み入れて、当該DNAを含む複製可能な組換えDNAを得る工程
- d) 当該組換えDNAで宿主細胞を形質転換させて、当該ペプチドを発現し得る
- 10 形質転換体を得る工程
- e) 該形質転換体を培養して、当該ペプチドを産生せしめ、培養混合物から当該ペプチドを回収する工程

当該薬剤のアミノ酸配列を有するペプチドは、例えば、自動ペプチド合成機を用いた化学合成によって得ることができる。

- 15 当該薬剤のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAは、例えば以下の如く調製される。なお、特に明記しない限り、一般的な遺伝子工学の手法は、成書（例えば、Molecular Cloning, a laboratory manual, Second edition, T. maniatitis et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)）に記載された方法に基づいて実施することが可能である。まず、ヒト細胞若しくはヒト臓器より抽出したmRNAをもとに作製したcDNA、市販のヒトcDNAライブラリー若しくはヒト染色体DNAを鋳

- 型DNAとする。次いで、既知の生理活性を有するペプチド遺伝子（例えば、ヒトTM遺伝子）の塩基配列を参照し、自動DNA合成機で化学合成したDNAプローブを用いて鋳型DNAをスクリーニングし、生理活性を有するペプチドの一部若しくは全てをコードするDNA（I）を得る。DNA（I）は、また、自動
- 5 DNA合成機を用いた化学合成のみで得ることも可能である。同様に、特定のリン脂質に親和性を有するペプチド（例えば、ヒトFactor VIII C末端領域）をコードするDNA（II）を得ることができる。DNA（I）及びDNA（II）を得るための他の好ましい方法の一例は、PCRを利用する方法である。すなわち、既知の遺伝子（例えば、ヒトTM遺伝子やヒトFactor VIII
- 10 遺伝子）の塩基配列を参照し、必要に応じて塩基配列や制限酵素認識部位を付加したDNAプライマーを化学合成し、前述のcDNAを鋳型DNAとしてPCRを行い、所望のDNAを得ることができる。なお、PCRは成書（例えば、PCR Protocols, A Guide to methods and applications, Michael A. I. et al., Academic Press (1990))を参考として行うことができる。以上のようにして得たDNA（I）とDNA（II）とを必要に応じて制限酵素で消化し、さらに必要に応じて化学合成したDNAリンカーを介在させて結合させれば、本発明の薬剤をコードするDNAを含むDNA断片を得ることができる。
- 20 ベクターに当該DNAを組み入れて当該DNAを含む複製可能な組換えDNAを得る工程、当該組換えDNAで宿主細胞を形質転換させて当該薬剤を発現し得る形質転換体を得る工程及び該形質転換体を培養して当該薬剤を産生せしめ培養

混合物から当該薬剤を回収する工程は、前述の特定のリン脂質に親和性を有するペプチドを得る方法と同様に実施することができる。

- 本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する新規ペプチドは、それを生理活性物質若しくはその集合体や封入体に結合させることによって、生理活性物質、その集合体若しくはその封入体を正常でない細胞、例えば、損傷を受けたり、変性したり若しくは活性化された細胞の表面に選択的に集積させることを可能にする手段を提供する。例えば、生理活性物質が封入体内に包含されたものである場合、特定のリン脂質に親和性を有する物質を、封入体の骨格を構成する成分に親和性を有する物質で修飾した後、生理活性物質を含む封入体と混合することにより、生理活性物質を含む封入体に当該特定のリン脂質に親和性を有する物質を表面に結合させて本発明の薬剤を得ることができる。好ましい例を例示すると、生理活性物質がリポソーム内に含まれている場合、特定のリン脂質に親和性を有する物質をホスファチジルエタノールアミン等の適当なリン脂質で修飾した後、リポソームと混合することにより得られる特定のリン脂質に親和性を有する物質をリポソーム表層に結合させることにより、本発明の薬剤を得る方法を挙げることができる。

本発明の物質若しくは薬剤、例えば実施例に示される物質等には著しい毒性は認められなかった。

- その他本発明の薬剤は、医薬用担体及び媒体、例えば滅菌水、生理食塩水、植物油、鉱油、高級アルコール、高級脂肪酸及び無害性有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、吸着防止剤、安定化剤、保存剤、保湿剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤及び無痛化剤等

と適宜組み合わせて注射剤及び経口剤などの医薬組成物やキットの形態をとることができる。本発明の薬剤は、好ましくは非経口的に、たとえば、静脈内注射、冠動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射若しくは皮下注射等により全身若しくは局部的に及び急速若しくは持続的に投与することができる。しかしながら、本発明の薬剤の使用はこれらの投与方法に制限されるものではない。さらに、他の薬剤と併用してもよい。

また、本発明の薬剤の投与量は、当該薬剤の含有する生理活性物質により、また、患者の病態により適宜調節することができる。

本発明はまた、生理活性物質を部位選択的に集積させることによってその作用効果を著しく上昇させるための新規な方法をも提供する。すなわち本発明は、特定のリン脂質に対する親和性を有する物質を所望の生理活性物質に結合させることにより、所望の生理活性物質を細胞表層へ集積させてその作用効果を高める方法を提供する。ここで、生理活性物質を集積させるための標的分子となるリン脂質は、あらゆる細胞が例外なく保持する細胞膜を構成する分子であるという点で、従来、薬剤をターゲッティングさせようとする時の標的分子とされてきた、細胞膜上に散在し必ずしも全ての細胞が保持するとは限らない前述の特定の抗原及びポリペプチドからなる特定の受容体や特定の分子等とは根本的に異なる。したがって、あらゆる細胞、細胞から構成されるあらゆる組織及び臓器が本発明の薬剤における生理活性物質の活性が上昇する場所となり得る。そして、生理活性物質に付与された親和性が特定のリン脂質に対するものであれば、あらゆる細胞、細胞から構成されるあらゆる組織及び臓器のうち特定の細胞、組織や臓器において生理活性物質の活性を選択的に上昇させることが可能となる。すなわ

ち本発明は、生理活性物質を正常でない細胞及び組織や臓器の表層に選択的に集積させてその作用効果を高めるという全く新しい概念に基づいた薬剤の送達方法若しくはドラッグデリバリーシステムを提供する。実施例に記載の通り、TM、UT I、UT Iの第二領域若しくはMCPにリン脂質に親和性を有するペプチド

5 を結合させたリン脂質に親和性を有する物質を作製した。この時、リン脂質に親和性を有するTM、リン脂質に親和性を有するUT I若しくはリン脂質に親和性を有するUT Iの第二領域ではその活性及びリン脂質に対する集積性が増加し、その作用効果が高まった。また、リン脂質に親和性を有するMCPにおいても、

成書（「補体学」、稲井眞彌（I N A I M.）ら著、医歯薬出版株式会社、1

10 9 8 2）に記載の補体依存性溶血の抑制作用の測定を行うことにより、活性の増加及びリン脂質に対する集積性の増加は確認できる。これらの実施例は、血液凝固反応が進展している部位、炎症や免疫担当細胞による細胞の活性化及び障害等のいわゆる免疫応答反応が進展している部位、活性酸素により障害を受けている部位及び蛋白分解酵素により細胞の活性化及び障害反応が進展している部位等に

15 おける細胞、組織及び臓器の表層に生理活性物質を選択的に集積させてその作用効果を高める、という上述の全く新しい概念に基づいた薬剤の送達方法若しくはドラッグデリバリーシステムの例示である。すなわち、本発明により、血液凝固障害、炎症及び免疫応答反応を伴う疾患の予防及び治療剤として有用な薬剤、新規ペプチド、それらの製造に必要なDNA、及び当該薬剤の製造方法が提供され

20 る。また、本発明の薬剤は医薬品に限定されるものではなく、例えば臨床試薬または研究試薬等に使用できる。

以下に実施例をもって、本発明をいっそう具体的に説明するが、これらは実施

の一例として示すものであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は当該分野における慣例略号に基づくものである。

また、遺伝子組換えに関わる技術として、特に記載のない限り、「Molecular Cloning, a laboratory manual, Second edition」(T. maniatitis et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))、「A Practical Guide to Molecular Cloning (2nd Edition)」(Bernard Perb et al., John Wiley & Sons (1988))、「PCR Protocols. A Guide to methods and applications」(Michael A. I. et al., Academic Press (1990))、「新細胞工学実験プロトコール」(東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社、1991年)、
15 「遺伝子工学ハンドブック」(村松正実ら(Muramatsu M.)編、羊土社、1991年)等の書物ならびに試薬あるいは器具に添付のプロトコールを採用して行った。

なお、実施例に開示するrsTMTd及びrsTMC2の発現プラスミドであるそれぞれpM1354及びpM1357を有する大腸菌は、平成8年12
20 月16日付で日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し(それぞれ受託番号P-16008及び受託番号P-16009)、さらに平成9年12月8日付で原寄託から国際寄託に移管し

た（受託番号FERM BP-6194及び受託番号FERM BP-6195）。また、ヒトMCPの発現プラスミドであるpM851を有する大腸菌は、平成4年1月22日付で日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し（受託番号P-12715）、さらに平成55年2月18日付で原寄託から国際寄託に移管した（受託番号FERM BP-4195）。

実施例1

ホスファチジルセリンに親和性を有するペプチドの化学合成

配列番号5、6及び22のアミノ酸配列を有するペプチドを、自動ペプチド合成機（432A型、アプライドバイオシステムズ社製）を用いて固相合成した。
なお、操作方法是特に明記しない限り、添付の操作マニュアルに従った。切り出し、脱保護反応を行い、エーテル中でペプチドを沈殿させた後、エーテルを除去して凍結乾燥した。これを10%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液で溶解し、C18カラム（CAPCELLPACC18AG120、資生堂社製）、高速液体クロマトグラフィー（625LCシステム、ウォーターズ社製）を用いて、0.1%トリフルオロ酢酸及び10%～60%アセトニトリル水溶液で直線濃度勾配法により精製した。

収量は、それぞれ10mg、6mg及び12mgであった。

実施例2

20 ヒトTMcDNAのクローニング及びヒトTM発現プラスミドの作製

ヒト胎盤約20gを材料として、グアニジンチオシアネート法により全RNAを抽出した。得られたRNAのうち10mgを使用して、オリゴdTセルロース

(タイプ7、ファルマシア社製) カラムに2回通すことにより、ポリA+RNA 約90 μ gを精製した。次にこのポリA+RNAを材料として1本鎖cDNAの合成を行った。すなわち、ポリA+RNA 10 μ gより、常法にしたがってオリゴdTをプライマーとして逆転写酵素により1本鎖cDNAを作製した。

- 5 一方、既知のヒトTM遺伝子の塩基配列 (K. Suzuki et al., EMBO J., Vol. 6, 1891 (1987), R. W. Jackman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 6425 (1987)) を参考として、ヒトTM遺伝子の塩基配列の一部に対応し、かつ5'末端に適当な制限酵素認識部位を含むDNAプライマー6種 (S1~S3及びA1~A3、図1及び図2) を化学合成機 (381A型、アプライドバイオシステムズ社製) にて作製した。なお、S3にはサイレントミューテーションにより制限酵素XhoI認識部位を導入した。また、A3は終止コドンに対応するDNA配列を含む。合成したDNAプライマーは、OPCカラム (アプライドバイオシステムズ社製) にて精製した。
- 15 次に、前述の1本鎖cDNAを鋳型DNAとし、化学合成したDNAプライマーを用いて表1の反応液組成によりPCRを行い、ヒトTMcDNAを3つの部分に分割して増幅した (用いたDNAプライマーと増幅される遺伝子との対応を表2に示した。)。遺伝子増幅はサーマルサイクラー (PJ1000型、パーキンエルマーシートス社製) を用い、94°Cで1分、55°Cで20分、72°Cで3分の反応サイクルを30回繰り返すことにより行い、反応終了後、反応液の一部を採り、アガロース電気泳動により目的とするサイズのDNAが増幅されていることを確認した。

表1 PCR反応液組成

5	蒸留水	77 μ l
	緩衝液**	10 μ l
	dNTP混合液 (2.5 mM)	8 μ l
	センスプライマー (1 μ g/ μ l)	1 μ l
	アンチセンスプライマー (1 μ g/ μ l)	1 μ l
	鋳型DNA (約20 ng/ μ l)	2.5 μ l
	耐熱性DNAポリメラーゼ (5 units/ μ l)	0.5 μ l
10	全量	100 μ l

*) 緩衝液: 0.1 M トリス塩酸 (pH = 8.3)

0.5 M 塩化カリウム

15 1.5 mM 塩化マグネシウム

表2 センスプライマーとアンチセンスプライマーの
組合わせと増幅遺伝子

	センス プライマー	アンチセンス プライマー	増幅遺伝子
組合わせⅠ	S 1	A 1	フラグメントⅠ
組合わせⅡ	S 2	A 2	フラグメントⅡ
組合わせⅢ	S 3	A 3	フラグメントⅢ

反応液から増幅された遺伝子（フラグメントⅠ～Ⅲ）をフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製、回収した。フラグメントⅠ、Ⅱ及びⅢはそれぞれSalⅠ/BamHⅠ、HindⅢ/SalⅠ、PstⅠ/BamHⅠで制限酵素消化した後、常法に従ってクローニング用ベクターpUC118へサブクローニングし、pUC118-FⅠ、pUC118-FⅡ、pUC118-FⅢを各々得た。続いて、pUC118-FⅠをHindⅢ/DdeⅠで、pUC118-FⅡをDdeⅠ/SalⅠで、またpUC118-FⅢをXhoⅠ/EcoRⅠで制限酵素消化し、常法に従ってアガロース電気泳動によりそれぞれ約450bp、約650bp、約650bpのDNA断片を分離、回収した。これら回収した3種類のDNA断片とpUC118の制限酵素HindⅢ/EcoRⅠ消化物とを常法に従ってライゲーションさせ、シグナルペプチドを含むヒトTMcDNA全長を含むプラスミドpUC118-TMを作製した（構築過程を

図3に示した)。また常法に従い、cDNA部分の塩基配列をDNAシーケンサー(370A、アプライドバイオシステムズ社製)にて決定したところ、ヒトTMcDNAであることが確認された。

次に、pUC118-TMを制限酵素SalI及びEcoRIで消化し、アガロース電気泳動により常法に従って約1.7kb長を有するDNA断片を分離、精製した。これを、哺乳動物細胞発現ベクターpcDL-SRα296(Y. Takebe et al., Mol. Cell. Biol., Vol. 8, 466 (1988))のクローニングサイトPstI-EcoRI間に、化学合成(既出)にて作製しOPCカラム(既出)にて精製したPstI-SalIリンカー(5'-TCGATGCA-3')と共に挿入し、ヒトTM発現ベクターpSRα-TMを構築した(構築過程を図3に示した)。

実施例3

ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒトTMを発現するプラスミドの作成

15 (1) pM1350の作製

1本鎖DNA4種(F1~F4、図4)を化学合成機(既出)で合成し、F1とF2及びF3とF4とをそれぞれ常法に従ってアニーリングさせ、5'末端にBsmI切断面/3'末端にEcoRI切断面を有する約30bp長のDNAフラグメントA、及び5'末端にNspV切断面/3'末端にEcoRI切断面を有する約90bp長のDNAフラグメントBを得た。次に、実施例2で作製したpUC118-TMを制限酵素BsmI及びEcoRIで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約4.6kbのDNA断片と、フラグメントAとを常法

に従ってライゲーションし、pUC118-TMsub1を得た。続いて、このpUC118-TMsub1を制限酵素MluI及びEcoRIで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約0.8 kbpのDNA断片と、実施例2で作製したpSR α -TMを制限酵素MluI及びEcoRIで消化しアガロース

5 電気泳動で分離、回収した約4.4 kbpのDNA断片とを常法に従ってライゲーションし、pSR α -TMsub1を得た。さらに、このpSR α -TMsub1を制限酵素NspV及びEcoRIで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約5.2 kbpのDNA断片と、フラグメントBとを常法に従ってライゲーションし、pM1350を得た（構築過程を図6に示した）。本プラ

10 スミドは、配列番号21のヌクレオチド配列の3'側に配列番号16のヌクレオチド配列が連結したヌクレオチド配列からなるDNAを含有し、これを用いれば、配列番号4のアミノ酸配列のC末端に配列番号5のアミノ酸配列が連結したアミノ酸配列からなるペプチドであるホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTM（以下、rsTMVIIと記載）を生産することができる。

15 (2) pM1357の作製

既知のヒトFactor VII遺伝子の塩基配列（William I. Wood et al., Nature, Vol. 312, 330 (1984)）を参考として、ヒトFactor VII遺伝子の塩基配列の一部に対応するDNAプライマー2種（S4及びA4、図1及び図2）、及び、ヒトFactor VII遺伝子

20 の塩基配列の一部に対応し、かつ5'末端に適当な制限酵素認識部位を含むDNAプライマー2種（S5及びA5、図1及び図2）の計4種を化学合成機（既出）にて作製した。

なお、A 5 は終始コドンに対応する DNA 配列を含む。合成した DNA プライマーは、O P C カラム（既出）にて精製した。

- 次に、実施例 2 でヒト胎盤由来のポリ A + RNA より作製した 1 本鎖 c DNA を鋳型 DNA とし、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして各々化学合成した DNA プライマー S 4 と A 4 とを用いて表 1 と同様の反応液により P C R を行い、ヒト F a c t o r Ⅷ C 2 領域を含む領域をコードする c DNA を増幅した。遺伝子増幅はサーマルサイクラー（既出）を用い、9 4 °C で 1 分、5 5 °C で 2 分、7 2 °C で 3 分の反応サイクルを 4 0 回繰り返すことにより行い、反応終了後、反応液の一部を採り、アガロース電気泳動により少なくとも目的とする
- 10 サイズの DNA が増幅されていることを確認した。

- 続いて、P C R によって得られた DNA 断片を鋳型 DNA とし、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとしてそれぞれ化学合成した DNA プライマー S 5 と A 5 とを用いて表 1 と同様の反応液により P C R を行い、ヒト F a c t o r Ⅷ C 2 領域をコードする c DNA を選択的に増幅した。遺伝子増幅はサーマルサイクラー（既出）を用い、9 4 °C で 1 分、5 5 °C で 2 分、7 2 °C で 3 分の反応サイクルを 3 0 回繰り返すことにより行い、反応終了後、反応液の一部を採り、アガロース電気泳動により目的とするサイズの DNA が増幅されていることを確認した。
- 15

- 反応液から増幅された遺伝子をフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製、回収し、制限酵素 B s m I 及び E c o R I で消化して 5' 末端に B s m I 切断面／3' 末端に E c o R I 切断面を有する約 0. 5 k b p 長の DNA 断片を得た。次に、実施例 2 で作製した p U C I 1 8 - T M を制限酵素 B s m
- 20

I 及び E c o R I で消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約 4. 6 k b p の DNA 断片と、上記の約 0. 5 k b p 長の DNA 断片とを常法に従ってライゲーションし、p U C I 1 8 - T M s u b 2 を得た。続いて、この p U C I 1 8 - T M s u b 2 を制限酵素 M l u I 及び N s p V で消化しアガロース電気泳動
5 で分離、回収した約 1. 2 k b p の DNA 断片と、実施例 3 - (1) で作製した p M 1 3 5 0 を制限酵素 M l u I 及び N s p V で消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約 4. 5 k b p の DNA 断片とを常法に従ってライゲーションし、p M 1 3 5 7 を得た（構築過程を図 7 に示した）。本プラスミドは、配列番号 2 1 のヌクレオチド配列の 3' 側に配列番号 2 0 のヌクレオチド配列が連結し
10 たヌクレオチド配列からなる DNA を含有し、これを用いれば、配列番号 4 のアミノ酸配列の C 末端に配列番号 9 のアミノ酸配列が連結したアミノ酸配列からなるペプチドであるホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒト T M（以下、r s T M C 2 と記載）を生産することができる。

(3) p M 1 3 5 6 の作製

- 15 既知のヒト F a c t o r Ⅷ 遺伝子の塩基配列（既出）を参考として、ヒト F a c t o r Ⅷ 遺伝子の塩基配列の一部に対応し、かつ 5' 末端に適当な制限酵素認識部位を含む DNA プライマー 1 種（S 6、図 1）を化学合成機（既出）にて作製した。合成した DNA プライマーは、O P C カラム（既出）にて精製した。
- 20 次に、実施例 3 - (2) において DNA プライマー S 4 と A 4 とを用いた P C R 反応によって増幅させたヒト F a c t o r Ⅷ C 2 領域を含む領域をコードする DNA 断片を鋳型 DNA とし、センスプライマー及びアンチセンスプライマーと

してそれぞれ化学合成したDNAプライマーS6と、実施例3-(2)で作製したDNAプライマーA5とを用いて表1と同様の反応液によりPCRを行い、ヒトFactorⅧC2領域C末端の60アミノ酸をコードするDNA断片を選択的に増幅した。遺伝子増幅はサーマルサイクラー(既出)を用い、94℃で51分、55℃で2分、72℃で3分の反応サイクルを30回繰り返すことにより行い、反応終了後、反応液の一部を採り、アガロース電気泳動により目的とするサイズのDNAが増幅されていることを確認した。

反応液から増幅された遺伝子をフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製、回収し、制限酵素BsmI及びEcoRIで消化して5'末端に10 BsmI切断面/3'末端にEcoRI切断面を有する約0.2kbp長のDNA断片を得た。次に、実施例2で作製したpUC118-TMを制限酵素BsmI及びEcoRIで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約4.6kbpのDNA断片と、上記の約0.2kbp長のDNA断片とを常法に従ってライゲーションし、pUC118-TMsub3を得た。続いて、このpUC118-TMsub3を制限酵素MluI及びNspVで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約0.9kbpのDNA断片と、実施例3-(1)で作製したpM1350を制限酵素MluI及びNspVで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約4.5kbpのDNA断片とを常法に従ってライゲーションし、pM1356を得た(構築過程を図8に示した)。本プラスミドは、配列番20号21のヌクレオチド配列の3'側に配列番号19のヌクレオチド配列が連結したヌクレオチド配列からなるDNAを含有し、これを用いれば、配列番号4のアミノ酸配列のC末端に配列番号8のアミノ酸配列が連結したアミノ酸配列からな

るペプチドであるホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTM
(以下、rsTMC2Dと記載)を生産することができる。

(4) pM1354の作製

1 本鎖DNA4種(F5~F8、図4)を化学合成機(既出)で合成し、F5
5 とF6及びF7とF8とをそれぞれ常法に従ってアニーリングさせ、5'末端に
NspV切断面/3'末端にEcoRI切断面を有する約60bp長のDNAフ
ラグメントC、及び5'末端にNspV切断面/3'末端にEcoRI切断面を
有する約90bp長のDNAフラグメントDを得た。次に、実施例3-(1)で
作製したpSR α -TMsub1を制限酵素NspV及びEcoRIで消化しア
10 ガロース電気泳動で分離、回収した約5.2kbpのDNA断片と、フラグメン
トCとを常法に従ってライゲーションし、pSR α -TMsub2を得た。続い
て、このpSR α -TMsub2を制限酵素NspV及びEcoRIで消化しア
ガロース電気泳動で分離、回収した約5.3kbpのDNA断片と、フラグメン
トDとを常法に従ってライゲーションし、pM1354を得た(構築過程を図9
15 に示した)。本プラスミドは、配列番号21のヌクレオチド配列の3'側に配列
番号17のヌクレオチド配列が連結したヌクレオチド配列からなるDNAを含有
し、これを用いれば、配列番号4のアミノ酸配列のC末端に配列番号6のアミノ
酸配列が連結したアミノ酸配列からなるペプチドであるホスファチジルセリンに
親和性を有する可溶型ヒトTM(以下、rsTMTdと記載する)を生産するこ
20 とができる。

(5) pM1355の作製

実施例3-(4)で作製したpSR α -TMsub2を制限酵素NspV及び

E c o R I で消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約 5.3 k b p の DNA 断片と、実施例 3 - (4) で調製したフラグメント C とを常法に従ってライゲーションし、p S R α - T M s u b 3 を得た。続いて、この p S R α - T M s u b 3 を制限酵素 N s p V 及び E c o R I で消化しアガロース電気泳動で
5 分離、回収した約 5.4 k b p の DNA 断片と、実施例 3 - (4) で調製したフラグメント D とを常法に従ってライゲーションし、p M 1 3 5 5 を得た（構築過程を図 10 に示した）。本プラスミドは、配列番号 21 のヌクレオチド配列の 3' 側に配列番号 18 のヌクレオチド配列が連結したヌクレオチド配列からなる DNA を含有し、これを用いれば、配列番号 4 のアミノ酸配列の C 末端に配列
10 番号 7 のアミノ酸配列が連結したアミノ酸配列からなるペプチドであるホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒト T M（以下、r s T M T d - 3 と記載）を生産することができる。

(6) p M 1 3 5 8 の作製

1 本鎖 DNA 2 種（F 9 及び F 10、図 4）を化学合成機（既出）で合成し、
15 F 9 と F 10 を常法に従ってアニーリングさせ、5' 末端に N s p V 切断面 / 3' 末端に E c o R I 切断面を有する約 60 b p 長の DNA フラグメント E を得た。次に、このフラグメント E と、実施例 3 - (4) で作製した p M 1 3 5 4 を制限酵素 N s p V 及び E c o R I で消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約 5.3 k b p の DNA 断片とを常法に従ってライゲーションし、p M 1 3 5
20 8 を得た（構築過程を図 14 に示した）。本プラスミドは、配列番号 21 のヌクレオチド配列の 3' 側に配列番号 26 のヌクレオチド配列が連結したヌクレオチド配列からなる DNA を含有し、これを用いれば、配列番号 4 のアミノ酸配列の

C末端に配列番号22のアミノ酸配列が連結したアミノ酸配列からなるペプチドであるホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒトTM（以下、rsTM TdDと記載）を生産することができる。

実施例4

5 未修飾可溶性TM発現プラスミドの作成

- 1 本鎖DNA2種（F11及びF12、図5）を化学合成機（既出）で合成し、両者を常法に従ってアニーリングさせ、5'末端にBsmI切断面／3'末端にEcoRI切断面を有する約20bp長のDNAフラグメントFを得た。
- 次に、実施例2で作製したpUC118-TMを制限酵素BsmI及びEcoRIで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約4.6kbpのDNA断片とフラグメントFとを常法に従って、ライゲーションし、pUC118-sTMを得た。続いて、このpUC118-sTMを制限酵素MluI及びEcoRIで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約0.8kbpのDNA断片と、実施例2で作製したpSR α -TMを制限酵素MluI及びEcoRIで消化しア
- 15 ガロース電気泳動で分離、回収した約4.4kbpのDNA断片とを常法に従ってライゲーションし、pM1399を得た。本プラスミドは、配列番号21の塩基配列を有するDNAを含有し、これを用いれば、配列番号4の未修飾可溶性ヒトTM（以下、rsTMと記載）を生産することができる。

実施例5

- 20 rsTMⅧ, rsTMC2, rsTMC2D, rsTMTd, rsTMTd-3, rsTMTdD及びrsTMの発現

本実施例3及び実施例4において作製したプラスミドpM1350、pM13

- 57、pM1356、pM1354、pM1355、pM1358及びpM1399を、各々COS-1細胞(ATCC CRL-1650)にDEAEデキストラン法(Lauren M. Sompayrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, 7575 (1981))に記載の方法を一部改変)にてトランスフェクションし、ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒトTM及び未修飾可溶性ヒトTMを発現した。すなわち、約9 cm²の組織培養用プラスチック容器あたり約3 × 10⁵個の細胞を播き、10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(以下、DMEMと記載する)2 ml、37℃で一日培養し、2 mlのDMEMで3回洗浄した後、
- 10 上記プラスミドを1 µg、50 mMトリス塩酸(pH 7.4)、0.2 mg / mlのDEAEデキストラン、150 µMクロロキンを含むDMEM 0.7 mlで置き換えた。37℃で4時間培養後培養液を吸引除去し、2 mlのDMEMで1回、10%牛胎児血清を含むDMEMで1回洗浄した後、10%牛胎児血清を含むDMEMを2 ml添加し37℃、24時間培養した。その後、
- 15 0.1%BSAを含むDMEMに換え、さらに37℃、72時間培養した後、培養上清を集めた。培養上清中には、各種ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒトTM(rsTMⅧ、rsTMC2、rsTMC2D、rsTMTd、rsTMTd-3及びrsTMTdD)及び未修飾可溶性ヒトTM(rsTM)がそれぞれ1~5 µg/ml含まれていた。
- 20 集めた培養液は、分画分子量3万の限外ろ過膜を使用して脱塩、濃縮した。pH 7.5に調整した後、0.1M NaCl、1mMベンザミジン塩酸、0.5mM CaCl₂及び0.5%トリトンX-100を含む0.02Mトリ

ス塩酸緩衝液で予めコンディショニングしたDIP-トロンビン-アガロースカラムを通過させて、活性画分を吸着させた。次いで、コンディショニングに使用したのと同じ緩衝液で洗浄した後、0.1 mM EDTA、1 mMベンザミジン塩酸、0.5 %トリトンX-100及び0.1 ~ 1 MのNaClを含む

5 0.02 Mトリス塩酸緩衝液で直線濃度勾配法により活性画分を溶出し、精製された各種ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒトTM (rsTMⅧ、rsTMC2、rsTMC2D、rsTMTd、rsTMTd-3、rsTMTdD) 及び未修飾可溶性ヒトTM (rsTM) をそれぞれ得た。

実施例6

10 リポソームの作成

金田 安史 (Kaneda, Y) の方法 (実験医学、Vol. 12, 184 (1994)) に準じて、各種リン脂質からなるリポソームを作製した。すなわち、クロロホルムに溶解したホスファチジルセリン (牛脳由来、シグマ社製) 10 mg、ホスファチジルコリン (卵黄由来、シグマ社製) 10 mg、ホスファチジルエタノールアミン (牛脳由来、シグマ社製) 10 mg 若しくはホスファチジン酸 (卵黄由来、シグマ社製) 10 mg をナス型フラスコに個々に若しくは混合して、分取し、窒素ガス下で乾燥させた後、10 mMリン酸カリウム溶液 50 μ l 及びテトラヒドロフラン 450 μ l を加えてナス型フラスコ中で再溶解した。このナス型フラスコを窒素ガス封入下でロータリーエバポレーター (RE

20 N-1型、岩城硝子社製) に装着し、45℃の湯浴中で回転させながら減圧乾燥してフラスコ内ガラス表面にリン脂質薄膜を形成させた。そこへ、20 mM CaCl₂、0.22 M NaClを含む30 mMトリス-イミダゾール緩衝

液 (pH 8.4) (以下、TIBSと記載) 200 μ l を添加した後、ボルテックスミキサーによる激しい振とうを30秒間行ってから37℃恒温槽で30秒間静置する操作を8回繰り返した。超音波洗浄機 (UT-53型、シャープ社製) の水槽にフラスコを入れ、5秒間超音波処理した後、再度ボルテックスミキサーによる激しい振とうを30秒間行い、TIBS (既出) を300 μ l 加えてシェーカー付き恒温槽で30分間振とうしてリボソーム溶液を調製した。この溶液は、リン脂質としてのリボソームを20 mg/ml 含んでいる。

実施例 7

プロテインC活性化の促進作用の測定

- 10 リン脂質非存在下でのプロテインC活性化の促進作用の測定は、Takahashiらの方法 (Thrombosis and Haemostasis, Vol. 73, 805 (1995)) に準じて行った。すなわち、TIBS (既出) 75 μ l、牛トロンビン (持田製薬社製) を40 U/ml 含むTIBS 25 μ l 及び実施例5に記載の各種ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTMを発現させたCOS-1細胞培養上清を必要に応じてCOS-1細胞培養上清で希釈した25 μ l 若しくは未修飾可溶型ヒトTMを発現させたCOS-1細胞培養上清を必要に応じてCOS-1細胞培養上清で希釈した25 μ l を混合し、37℃で10分間加温した。そこへ、ヒトプロテインC (アメリカンダイアグノスティカ社製) を12 U/ml 含むTIBS 25 μ l を添加し、37℃
- 20 で10分間反応させた後、アンチトロンビンIII (ミドリ十字社製) 0.15 U/ml 及びヘパリン (持田製薬社製) 15 U/ml を含むTIBS 100 μ l を加えてプロテインC活性化反応を停止させた。停止反応を37℃で10分間継続さ

せた後、合成基質 S-2366 (第一化学薬品社製) 3.2 mM を含む TIBS 250 μ l を添加し、37°C で 5 分間反応させた。続いて、50% 酢酸水溶液 1.5 ml を加えて全ての反応を停止させ、活性化プロテイン C によって切断された合成基質の濃度を、波長 405 nm で分光光度計 (DU 640、ベックマン社製) により測定した。

一方、リン脂質存在下でのプロテイン C 活性化促進作用の測定は上記の方法を一部変更して行った。すなわち、実施例 6 で作製したホスファチジルセリンからなるリポソームを 6 mg/ml 及び 2% BSA を含む TIBS (既出) 75 μ l を 37°C で 1 時間加温し、リポソームに対するポリペプチドの非特異的吸着をブロッッキングした。そこへ、前述の方法によりリン脂質非存在下で測定したプロテイン C 活性化の促進作用の値が同一となるよう実施例 5 に記載の各種ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒト TM を発現させた COS-1 細胞培養上清を必要に応じて COS-1 細胞培養上清で希釈した 25 μ l 若しくは未修飾可溶型ヒト TM を発現させた COS-1 細胞培養上清を必要に応じて COS-1 細胞培養上清で希釈した 25 μ l を加えて 37°C で 2 時間反応させ、続いて、牛トロンビン 40 U/ml を含む TIBS 25 μ l を加えて 37°C、10 分間反応させた。そこへ、ヒトプロテイン C を 12 U/ml 含む TIBS 25 μ l を添加し、37°C で 10 分間反応させ、その後は前述の方法と同一の操作により、プロテイン C 活性化促進作用の測定を行った。但し、活性化プロテイン C によって切断された合成基質の濃度の測定は、40,000 回転で 15 分間遠心分離操作してリポソームを除去した反応液について行った。その結果、図 11 に示すように、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒト TM は、リン脂

質存在下でそのプロテインC活性化の促進作用が著しく高まることが明らかとなり、その程度は、rsTMに比較してrsTMⅦで約5倍、rsTMC2Dで約10倍、rsTMTd、rsTMTdD及びrsTMTd-3で約16～18倍、rsTMC2で約50倍であった。（リボソーム非存在下でのプロテインC活性化促進作用の強さを1として、ホスファチジルセリンからなるリボソーム存在下における相対的なプロテインC活性化促進作用の強さを示した。）

実施例 8

特定のリン脂質に対する特異性（1）

実施例6で作製したホスファチジルセリン以外のリン脂質からなるリボソームを用いて、実施例7に記載の方法に従って、ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTM（rsTMC2）及び未修飾可溶型ヒトTM（rsTM）のプロテインC活性化の促進作用を測定した。その結果、図12に示したように、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒトTMは、ホスファチジルセリンからなるリボソーム存在下でのみ選択的にそのプロテインC活性化の促進作用が著しく高まることが明らかとなった。（リボソーム非存在下でのプロテインC活性化促進作用の強さを1として、各種リボソーム存在下における相対的なプロテインC活性化促進作用の強さを示した。）

実施例 9

リン脂質との結合能の評価

96穴マイクロタイタープレート（Immulon I、ダイナテック社製）に、ホスファチジルセリンを溶解させたエタノール若しくはホスファチジルコリンを溶解させたエタノール100μlを添加し、風乾させて1穴あたり

1 μ g のリン脂質を固相化した。そこへ、1% BSA 及び 0.15 M NaCl
を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を 200 μ l 添加し、37℃で
2 時間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除去後、実施例 5 で作製した
rsTMC2 を発現させた COS-1 細胞培養上清に終濃度 1% BSA となるよ
5 う 20% BSA 水溶液を添加したもの 100 μ l、同様に調製した 1% BSA 含
有 rsTMTd 発現 COS-1 細胞培養上清若しくは 1% BSA 含有 rsTM 発
現 COS-1 細胞培養上清 100 μ l を加え、4℃で 16 時間反応させた。反応
終了後は、成書 (「酵素免疫測定法 (第 3 版)」、石川栄治 (Ishikawa
E.) ら著、医学書院、1987) に記載の一般的方法に従って、En
10 zyme Immuno Assay (EIA) によりリン脂質に結合した各種
ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒト TM 量及び未修飾可溶型ヒト
TM 量を測定した。すなわち、1 次抗体として抗ヒト TM モノクロナール抗
体 (24 FM、セルビオ社製)、2 次抗体として西洋わさびパーオキシダーゼ標
識抗マウス IgG 抗体 (P0260、ダコ社製) を用い、テトラメチルベンジジ
15 ンを発色基質としてその吸光度を波長 450 nm で分光光度計 (NJ-2100
型、インターメッド社製) により測定した。その結果、図 13 に示すように、ホ
スファチジルセリンに親和性を有する可溶型ヒト TM はホスファチジルセリンと
のみ結合性を示し、その結合の程度と図 11 に示されたリボソーム存在下での
プロテイン C の活性化促進作用の強さとが相関することが明らかとなった。

20 実施例 10

UTI cDNA のクローニング及び UTI 発現プラスミドの作製

既知のヒト α -マイクログロブリンをコードする塩基配列 (Kaume

yer, J. F. et al., Nucl. Acids Res., Vol. 14, 7839 (1986))を参考として、ヒト α -ミクロglobリンシグナルペプチドをコードする遺伝子の塩基配列の一部に対応し、かつ5'末端に適切な制限酵素認識部位を含むDNAプライマー(S7、図1)を化学合成機
5 (既出)にて作製した。また、既知のヒトUTL遺伝子の塩基配列(Kaume
yer, J. F. et al., Nucl. Acids Res., Vol. 14, 7839 (1986))を参考として、ヒトUTLをコードする遺伝子の塩基配列の一部に対応し、かつ5'末端に適切な制限酵素認識部位を含むDNA
プライマー(A6、図2)を化学合成機(既出)にて作製した。なお、A6は終
10 始コドンに対応するDNA配列を含む。合成したDNAプライマーは、OPCカ
ラム(既出)にて精製した。

次に、市販のヒト肝臓由来のcDNA(クローンテック社製)を鋳型DNAとし、化学合成したDNAプライマーS7とA6を用いて表1(既出)の反応液組成によりPCRを行い、ヒト α -ミクロglobリンcDNA及びその3'側に
15 続くヒトUTLcDNAを増幅した。遺伝子増幅はサーマルサイクラー(既出)
を用い、94℃で45秒、60℃で45秒、72℃で2分30秒の反応サイクル
を40回繰り返すことにより行い、反応終了後、反応液の一部を採り、アガロース電気泳動により目的とするサイズのDNAが増幅されていることを確認し
た。

20 反応液から増幅された遺伝子をフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製、回収し、BamHI/HindⅢで制限酵素消化した後、常法に従ってクローニング用ベクターpUC119へサブクローニングし、pM121

2を得た（構築過程を図15に示した）。また常法に従い、cDNA部分の塩基配列をDNAシーケンサー（既出）にて決定し、ヒト α -ミクロglobリン cDNA及びその3'側に続くヒトUTI cDNAであることを確認した。

次に、既知のヒト α -ミクロglobリンシグナルペプチドをコードする遺伝子の塩基配列及びヒトUTIをコードする遺伝子の塩基配列の一部を含み、かつ5'末端に適当な制限酵素認識部位を含むDNAプライマー（S8、図1）、及び、ヒトUTIをコードする遺伝子の塩基配列の一部を含み、かつ5'末端に適当な制限酵素認識部位を含むDNAプライマー（A7、図2）を化学合成機（既出）にて作製した。なお、A7は終始コドンに対応するDNA配列を含む。合成したDNAプライマーは、OPCカラム（既出）にて精製した。

続いて、これらのDNAプライマーを用い、前述のpM1212を鋳型DNAとして表1（既出）の反応液組成によりPCRを行い、ヒト α -ミクロglobリンシグナルペプチドを有するヒトUTI cDNAを増幅した。遺伝子増幅はサーマルサイクラー（既出）を用い、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分の反応サイクルを25回繰り返すことにより行い、反応終了後、反応液の一部を採り、アガロース電気泳動により目的とするサイズのDNAが増幅されていることを確認した。

反応液から増幅された遺伝子をフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製、回収し、XbaI/NotIで制限酵素消化し、アガロース電気泳動により常法に従って約0.5 kbp長を有するDNA断片を分離、精製した。これを、哺乳動物細胞発現ベクターとして知られているpEF-BOS (S. Mizushima et al., Nucleic Acids

Res., Vol. 18, 5322 (1990)) の改良型ベクターである
pEF-BOS2AのクローニングサイトXbaI-NotI間に挿入し、ヒト
UTI発現ベクターpM1213を構築した(構築過程を図15に示した)。p
EF-BOS2Aはヒトポリペプチド鎖伸長因子1 α のプロモーター領域及びS
5 V40のポリA付加シグナル配列を有する。pM1213は配列番号28の塩基
配列を有するDNAを含有し、これを用いれば、配列番号24の未修飾UT
I(以下rUTIと記載する)を生産することができる。

実施例11

ホスファチジルセリンに親和性を有するUTIを発現するプラスミドの作成
10 1本鎖DNA2種(F13及びF14、図5)を化学合成機(既出)で合
成し、F13とF14を常法に従ってアニーリングさせ、5'末端にEcoRI
切断面/3'末端にHindIII切断面を有する約70bp長のDNAフラグメン
トGを得た。次に、フラグメントGを常法に従ってクローニング用ベクター
pUC119のクローニングサイトEcoRI-HindIII間にサブクロー
15 ニングし、pUC119-Multiを得た。続いて、このpUC119-
Multiを制限酵素Eco47III及びNotIで消化しアガロース電気泳動で
分離、回収した約3.2kbpのDNA断片と、実施例10で作製したpM12
13を制限酵素Eco47III及びNotIで消化しアガロース電気泳動で分離、
回収した約0.5kbpのDNA断片とを常法に従って、ライゲーションし、p
20 UC119-UTI-sub1を得た。

一方、既知のヒトUTIをコードする塩基配列(既出)及びヒトFactor
VIIIをコードする塩基配列(既出)を参考として、ヒトUTIをコードする遺伝子

の塩基配列の一部及びヒトFactorⅧをコードする遺伝子の塩基配列の一部
に対応するDNAプライマー（S9、図1）とヒトFactorⅧをコードする
遺伝子の塩基配列の一部に対応し、かつ5'末端に適当な制限酵素認識部位を
含むDNAプライマー（A8、図2）を化学合成機（既出）にて作製した。なお、
5 A8は終始コドンに対応するDNA配列を含む。合成したDNAプライマーは、
OPCカラム（既出）にて精製した。

次に、これらのDNAプライマーを用い、実施例3-(2)で作製したpM1
357を鋳型DNAとして表1（既出）の反応液組成によりPCRを行い、ヒト
FactorⅧC2領域を含み、5'末端にヒトUTIをコードする遺伝子の塩
10 基配列の一部に対応する領域を有する約0.6kbpのDNA断片を増幅した。
遺伝子増幅はサーマルサイクラー（既出）を用い、94℃で1分、55℃で
2分、72℃で3分の反応サイクルを30回繰り返すことにより行い、反応終了
後、反応液の一部を採り、アガロース電気泳動により目的とするサイズのDNA
が増幅されていることを確認した。反応液から増幅された遺伝子をフェノール・
15 クロロホルム処理、エタノール沈殿により精製、回収し、制限酵素BsgI及び
NotIで消化した後、前述のpUC119-UTI-sub1を制限酵素BsgI及び
NotIで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約3.1kbp
のDNA断片と常法に従ってライゲーションし、pUC119-UTI-C2-
sub1を得た。続いて、このpUC119-UTI-C2-sub1を制限酵
20 素Eco47Ⅲ及びNotIで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した
約1.0kbpのDNA断片と、実施例10で作製したpM1213を制限酵素
Eco47Ⅲ及びNotIで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約

4. 0 k b p の DNA 断片とを常法に従ってライゲーションし、p M 1 3 8 0 を得た（構築過程を図 1 6 に示した）。本プラスミドは、配列番号 2 8 のヌクレオチド配列の 3' 側に配列番号 2 0 のヌクレオチド配列が連結したヌクレオチド配列からなる DNA を含有し、これを用いれば、配列番号 2 4 のアミノ酸配列の C 末端に配列番号 9 のアミノ酸配列が連結したアミノ酸配列からなるペプチドであるホスファチジルセリンに親和性を有するヒト U T I （以下、r U T I C 2 と記載する）を生産することができる。

実施例 1 2

r U T I 及び r U T I C 2 の発現と精製

- 10 本実施例 1 1 及び実施例 1 0 において作製したプラスミド p M 1 3 8 0 及び p M 1 2 1 3 をそれぞれ C O S - 1 細胞（既出）に D E A E デキストラン法（既出）にてトランスフェクションし、ホスファチジルセリンに親和性を有するヒト U T I 及び未修飾ヒト U T I を発現した。すなわち、約 9 cm^2 の組織培養用プラスチック容器あたり約 3×10^5 個の細胞を播き、1 0 % 牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地（既出）2 m l、3 7 ° C で一日培養し、2 m l の D M E M で 3 回洗浄した後、上記プラスミドを $1 \mu \text{g}$ 、5 0 m M トリス塩酸（p H 7 . 4）、0 . 2 m g / m l D E A E デキストラン、1 5 0 μM クロロキンを含む D M E M 0 . 7 m l で置き換えた。3 7 ° C で 4 時間培養後培養液を吸引除去し、2 m l の D M E M で 1 回、1 0 % 牛胎児血清を含む D M E M で 1 回
- 20 洗浄した後、1 0 % 牛胎児血清を含む D M E M を 2 m l 添加し 3 7 ° C、2 4 時間培養した。その後、0 . 1 % B S A を含む D M E M に換え、さらに 3 7 ° C、7 2 時間培養した後、培養上清を集めた。培養上清中には、ホスファチジルセリンに

親和性を有するヒトUTI (rUTIC2) 及び未修飾ヒトUTI (rUTI) がそれぞれ1~5 μ g/ml含まれていた。

集めた培養液は、分画分子量1万の限外ろ過膜を使用して脱塩、濃縮し、10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) で予め平衡化した抗UTI抗体-セファロース 5 カラムを通過させて活性画分を吸着させた。次いで、0.5 M NaCl を含む10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した後、0.1 M クエン酸 (pH 2.0) 及び3 M チオシアン酸カリウムを含む0.1 M クエン酸により活性画分を溶出した。溶出された活性画分を10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析し、精製されたホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTI (rUTIC2) 及び未修飾ヒトUTI (rUTI) をそれぞれ得た。

実施例13

UTIの第二領域を発現するプラスミドの作製

1 本鎖DNA 2種 (F15及びF16、図5) を化学合成機 (既出) で合成し、F15とF16を常法に従ってアニーリングさせ、5'末端にEco47
15 III切断面/3'末端にApaI切断面を有する約70 bp長のDNAフラグメントHを得た。次に、本実施例11で得たpUC119-UTI-sub1を制限酵素Eco47 III及びApaIで消化し、アガロース電気泳動で分離、回収した約3.4 kbpのDNA断片と、フラグメントHとを常法に従ってライゲーションし、pUC119-R-020-sub1を得た。続いて、このpUC119
20 -R-020-sub1を制限酵素Eco47 III及びNotIで消化し、アガロース電気泳動で分離、回収した約0.2 kbpのDNA断片と、実施例10で作製したpM1213を制限酵素Eco47 III及びNotIで消化しアガロ-

ス電気泳動で分離、回収した約4.0 kbpのDNA断片とを常法に従ってライゲーションし、pM1370を得た（構築過程を図17に示した）。pM1370は配列番号27の塩基配列を有するDNAを含有し、これを用いれば、配列番号23で表される未修飾のヒトUTIの第二領域のN末端にAla-Val5-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Asp-Glyから成る11アミノ酸が付加したポリペプチド（以下rR-020と記載する）を生産することができる。

実施例14

ホスファチジルセリンに親和性を有するUTIの第二領域を発現するプラスミド
10 の作製

実施例13で作製したpUC119-R-020-sub1を制限酵素BsgI及びNotIで消化し、アガロース電気泳動で分離、回収した約3.3 kbpのDNA断片と、実施例11で作製したpUC119-UTI-C2-sub1を制限酵素BsgI及びNotIで消化し、アガロース電気泳動で分離、回収した約0.5 kbpのDNA断片とを常法に従ってライゲーションし、pUC119-R-020-C2-sub1を得た。続いて、このpUC119-R-020-C2-sub1を制限酵素Eco47Ⅲ及びNotIで消化し、アガロース電気泳動で分離、回収した約0.8 kbpのDNA断片と、実施例10
15 で作製したpM1213を制限酵素Eco47Ⅲ及びNotIで消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約4.0 kbpのDNA断片とを常法に従ってライゲーションし、pM1371を得た（構築過程を図18に示した）。本プラスミドは、配列番号27のヌクレオチド配列の3'側に配列番号20のヌクレオチド

配列が連結したヌクレオチド配列からなるDNAを含有し、これを用いれば、配列番号23のアミノ酸配列のN末端にはAla-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Asp-Glyから成る11アミノ酸配列が連結し、C末端には配列番号9のアミノ酸配列が連結したアミノ酸配列5 からなるペプチドであるホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTIの第二領域（以下、rR-020C2と記載する）を生産することができる。

実施例15

rR-020及びrR-020C2の発現と精製

本実施例14及び実施例13において作製したプラスミドpM1371及びpM1370を、それぞれCOS-1細胞（既出）にDEAEデキストラン法（既出）にてトランスフェクションし、ホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTIの第二領域及び未修飾ヒトUTIの第二領域を発現した。すなわち、約9cm²の組織培養用プラスチック容器あたり約3×10⁵個の細胞を播き、10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地（既出）2ml、37℃で一日培養し、2mlのDMEMで3回洗浄した後、上記プラスミドを1μg、50mMトリス塩酸（pH7.4）、0.2mg/ml DEAEデキストラン、150μMクロロキンを含むDMEM0.7mlで置き換えた。37℃で4時間培養後培養液を吸引除去し、2mlのDMEMで1回、10%牛胎児血清を含むDMEMで1回洗浄した後、10%牛胎児血清を含むDMEMを2ml添加し37℃、24時間培養した。その後、0.1%BSAを含むDMEMに換え、さらに37℃、72時間培養した後、培養上清を集めた。培養上清中には、各種ホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTIの第二領域（rR-

020C2)及び未修飾ヒトUTIの第二領域(rR-020)がそれぞれ1〜5 µg/ml含まれていた。

集めた培養液は、分画分子量3千の限外ろ過膜を使用して脱塩、濃縮し、10 mMリン酸緩衝液(pH7.5)で予め平衡化した抗UTI抗体-セファロース 5 カラムを通過させて活性画分を吸着させた。次いで、0.5 M NaClを含む10 mMリン酸緩衝液(pH7.5)で洗浄した後、0.1 Mクエン酸(pH2.0)及び3 Mチオン酸カリウムを含む0.1 Mクエン酸により活性画分を溶出した。溶出された活性画分を10 mMリン酸緩衝液(pH7.5)に対して透析し、精製されたホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTIの第二領域(rR-020C2)及び未修飾ヒトUTIの第二領域(rR-020)をそれぞれ得た。

実施例16

トリプシン阻害活性の測定

実施例12及び実施例15に記載のヒトUTI(rUTI)及びヒトUTIの第二領域(rR-020)とホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTI(rUTIC2)及びホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTIの第二領域(rR-020C2)を発現させたCOS-1細胞培養上清100 µlに、0.1%BSAを含む0.2 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.8)(以下緩衝液A)で希釈した牛トリプシン(シグマ社製)200 BAEEU/mlを100 µl添加し、25℃で10分間反応させた後、蒸留水にて溶解した合成基質L-BAPA(ペプチド研究所社製)2 mg/mlを含む基質溶液100 µlを添加し、25℃で12分間反応させた。続いて、50%酢酸水溶液100 µlを加え

て全ての反応を停止させ、残存するトリプシンによって切断された合成基質の濃度を、波長405nmで分光光度計（既出）により測定した。なお、コントロールとして、大腸菌で発現・精製した配列番号23のアミノ酸配列からなるヒトUTIの第二領域（特許出願公開報 特開平5-84083）を用いた。

5 実施例17

活性酸素産生抑制効果の測定

加藤らの方法（加藤克明（K a t o u K.）ら、医学と薬学、34巻、499（1995））に準じて、チトクロームC還元法により白血球の活性酸素産生量を測定した。すなわち、ウサギ腹腔より採取した白血球を、2mMグルコース、5mM HEPESを含む生理食塩水（pH7.4）に 1×10^6 個/mlとなるよう懸濁させたもの0.49mlに、132 μ MチトクロームC、2mMグルコース、2mM $CaCl_2$ 、5mM HEPES及び実施例12に記載のホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTI（rUTIC2）若しくは未修飾ヒトUTI（rUTI）を発現させたCOS-1細胞培養上清を含む生理食塩水（pH7.4）を0.5ml加え、37℃、3分間反応後、1mg/mlのサイトカラシンE及び10mg/mlのコンカナバリンAをそれぞれ5 μ lずつ加え、波長550nmにおける吸光度の増加速度を分光光度計（既出）にて測定した。

その結果、図19に示すように、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTI（rUTIC2）は、未修飾ヒトUTI（rUTI）に比べて活性酸素産生抑制作用が高いことが明らかとなった。

実施例 18

プロトロンビナーゼ阻害効果の測定

プロトロンビナーゼ活性の測定は、Nesheim, M. E. らの方法
(The Journal of Biological Chemistry, Vol. 254, 10952 (1979)) を一部変更して行った。すなわ
ち、6 μ M Factor Xa (アメリカンダイアグノスティカ社製)、
6 μ M Factor Va (ヘマトロジカルテクノロジー社製)、0.15
M NaCl、2 mM CaCl₂ 及び 0.1% BSA を含む 50 mM トリス塩酸緩
衝液 (pH 7.4) (以下緩衝液 B) 100 μ l に、実施例 6 と同様の操作によ
り調製したホスファチジルセリン含有率 25%、ホスファチジルコリン含有
率 75% からなるリボソーム (但し、リボソーム作製時には TIBS の代りに B
SA を含まない緩衝液 B を用いて作製) をリン脂質として 36 mg/ml 含む緩
衝液 B 25 μ l を添加し、37°C で 10 分間加温した。次に、実施例 15 に記載
のホスファチジルセリンに親和性を有するヒト UTI の第二領域 (rR-020
C2) を発現させた COS-1 細胞培養上清若しくは大腸菌で発現・精製した配
列番号 23 のアミノ酸配列からなるヒト UTI の第二領域 (既出) を必要に応じ
て COS-1 細胞培養上清で希釈した 125 μ l を添加し、37°C で 10 分間加
温した。そこへ、プロトロンビン (エンザイムリサーチラボラトリー社製)
を 60 μ M 含む緩衝液 B 50 μ l を添加し、37°C で 30 分間反応させた
後、EDTA 10 mM を含む緩衝液 B 300 μ l を加えてトロンビン産生反応を
停止させた。続いて、前述のトロンビン産生反応で得られた反応停止後の溶
液 100 μ l を 37°C で 10 分間加温した後、1.5 mM 合成基質 S-2238

- (第一化学薬品社製)、0.15M NaCl、10mMEDTA及び0.1%BSAを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)100 μ lを添加し、37℃で10分間反応させた後、50%酢酸水溶液100 μ lを加えて全ての反応を停止させ、産生されたトロンビンによって切断された合成基質の濃度を、
- 5 波長405nmで分光光度計(既出)により測定した。その結果、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTIの第二領域(rR-020C2)は、大腸菌で発現・精製した配列番号23のアミノ酸配列からなるヒトUTIの第二領域(既出)よりも約10倍高いプロトロンビナーゼ活性阻害効果を示すことが明らかとなった(図20)。なお、大腸菌で発現・精製した配列番号23の
- 10 アミノ酸配列からなるヒトUTIの第二領域(既出)とCOS-1細胞で発現させた未修飾ヒトUTIの第二領域(rR-020)との間には、活性の差は認められなかった。

実施例19

特定のリン脂質に対する特異性(2)

- 15 実施例6と同様の操作により調製したリボソームを用いて、実施例18に記載の方法に従って、ホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTIの第二領域(rR-020C2)及び未修飾ヒトUTIの第二領域(rR-020)のプロトロンビナーゼ活性阻害効果を測定した。その結果、図21に示したように、本発明のホスファチジルセリンに親和性を有するヒトUTIの第二領域(rR-0
- 20 20C2)は、ホスファチジルセリン特異的にプロトロンビナーゼ活性阻害効果が促進されることが明らかとなった。

実施例 20

ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒトMCPを発現するプラスミドの作成

1 本鎖DNA 4種 (F17、F18、F19及びF20、図5)を化学合成機
5 (既出)で合成し、F17とF18及びF19とF20をそれぞれ常法に従って
アニーリングさせ、5'末端にEcoRI切断面/3'末端にHindIII切断
面を有する約60bp長のDNAフラグメントI及び5'末端にNspV切断面
/3'末端にKpnI切断面を有する約90bp長のDNAフラグメントJを得
た。次に、国際特許出願公開公報WO/93/17122に記載のpUC19-
10 sMCP(D)を制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化し、アガロース電
気泳動で分離、回収した約3.6kbpのDNA断片とフラグメントIとを常法
に従ってライゲーションし、pUC19-sMCP(D)-C2-sub1を得
た。次に、このpUC19-sMCP(D)-C2-sub1を制限酵素Sph
I及びNspVで消化し、アガロース電気泳動で分離、回収した約3.7kbp
15 のDNA断片と、実施例3-(2)で作製したpM1357を制限酵素SphI
及びNspVで消化し、アガロース電気泳動で分離、回収した約0.4kbpの
DNA断片とを常法に従ってライゲーションし、pUC19-sMCP(D)-
C2-sub2を得た。続いて、このpUC19-sMCP(D)-C2-sub
b2を制限酵素NspV及びKpnIで消化し、アガロース電気泳動で分離、回
20 収した約4.0kbpのDNA断片とフラグメントJとを常法に従ってライゲ
ーションし、pUC19-sMCP(D)-C2を得た。更に、このpUC19-
sMCP(D)-C2を制限酵素EcoRI及びKpnIで消化し、アガロース

電気泳動で分離、回収した約 1.5 kbp の DNA 断片と、国際特許出願公開公報 WO/93/17122 に記載の pM851 を制限酵素 EcoRI 及び KpnI で消化しアガロース電気泳動で分離、回収した約 4.0 kbp の DNA 断片とを常法に従ってライゲーションし、pM1390 を得た（構築過程を 5 図 22 に示した）。本プラスミドは、配列番号 29 のヌクレオチド配列の 3' 側に配列番号 20 のヌクレオチド配列が連結したヌクレオチド配列からなる DNA を含有し、これを用いれば、配列番号 25 のアミノ酸配列の C 末端に配列番号 9 のアミノ酸配列が連結したアミノ酸配列からなるペプチドであるホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒト MCP（以下、rsMCP（D）C2 と記載 10 する）を生産することができる。

実施例 21

rsMCP（D）及び rsMCP（D）C2 の発現

本実施例 20 において作製したプラスミド pM1390 及び国際特許出願公開公報 WO/93/17122 に記載の pM851 を、それぞれ COS-1 15 細胞（既出）に DEAE デキストラン法（既出）にてトランスフェクションし、ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒト MCP（rsMCP（D）C2）及び未修飾可溶性ヒト MCP（rsMCP（D））を発現した。すなわち、約 9 cm² の組織培養用プラスチック容器あたり約 3×10^5 個の細胞を抜き、10% 牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地（既出）2 ml、20 37℃ で一日培養し、2 ml の DMEM で 3 回洗浄した後、上記プラスミドを 1 µg、50 mM トリス塩酸（pH 7.4）、0.2 mg/ml の DEAE デキストラン、150 µM クロロキンを含む DMEM 0.7 ml で置き換えた。37℃

で4時間培養後培養液を吸引除去し、2 mlのDMEMで1回、10%牛胎児血清を含むDMEMで1回洗浄した後、10%牛胎児血清を含むDMEMを2 ml添加し37℃、24時間培養した。その後、0.1%BSAを含むDMEMに換え、さらに37℃、72時間培養した後、培養上清を集めた。培養上清中には、

5 各種ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒトMCP (rsMCP (D) C2) 及び未修飾可溶性ヒトMCP (rsMCP (D)) がそれぞれ1～5 µg/ml含まれていた。

集めた培養液は、国際特許出願公開公報WO/93/17122に記載の方法に従って精製し、ホスファチジルセリンに親和性を有する可溶性ヒトMCP

10 (rsMCP (D) C2) 及び未修飾可溶性ヒトMCP (rsMCP (D)) をそれぞれ得た。

産業上の利用可能性

本発明によれば、血液凝固障害、炎症及び免疫応答を伴う疾患の予防及び治療剤として有用な薬剤、新規ペプチド、それらの製造に必要なDNA、及び当該薬

15 剤の製造方法を提供することができる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 130

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (A1)

配列

Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
 20 25 30 35
 Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro
 40 45 50
 Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr
 55 60 65 70
 Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile
 75 80 85 90
 Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val
 95 100 105
 Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
 110 115 120 125

Pro Pro Leu Leu

130

配列番号 : 2

配列の長さ : 18

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (A2)

配列

Xaa Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg

1 5 10 15

但し、Xaa はThr 若しくはLeu。

配列番号 : 3

配列の長さ : 12

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (A3)

配列

Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

1 5 10

配列番号 : 4

配列の長さ: 4 9 7

配列の型: アミノ酸

配列の種類: ペプチド (rsTM)

配列

Ala	Pro	Ala	Glu	Pro	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Gln	Cys	Val	Glu	His	Asp	Cys	Phe
1				5					10					15			
Ala	Leu	Tyr	Pro	Gly	Pro	Ala	Thr	Phe	Leu	Asn	Ala	Ser	Gln	Ile	Cys	Asp	Gly
	20				25					30					35		
Leu	Arg	Gly	His	Leu	Met	Thr	Val	Arg	Ser	Ser	Val	Ala	Ala	Asp	Val	Ile	Ser
		40					45						50				
Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Gly	Arg	Arg	Arg	Leu	Trp	Ile	Gly	Leu
55				60					65					70			
Gln	Leu	Pro	Pro	Gly	Cys	Gly	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Gly	Pro	Leu	Arg	Gly	Phe
	75						80					85				90	
Gln	Trp	Val	Thr	Gly	Asp	Asn	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ser	Arg	Trp	Ala	Arg	Leu	Asp
		95						100					105				
Leu	Asn	Gly	Ala	Pro	Leu	Cys	Gly	Pro	Leu	Cys	Val	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Glu
	110					115				120					125		
Ala	Thr	Val	Pro	Ser	Glu	Pro	Ile	Trp	Glu	Glu	Gln	Gln	Cys	Glu	Val	Lys	Ala
		130						135					140				
Asp	Gly	Phe	Leu	Cys	Glu	Phe	His	Phe	Pro	Ala	Thr	Cys	Arg	Pro	Leu	Ala	Val
145				150						155					160		

Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly Thr Pro Phe Ala
 165 170 175 180
 Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
 185 190 195
 Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His
 200 205 210 215
 Trp Ala Arg Glu Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys
 220 225 230
 Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly
 235 240 245 250
 Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
 255 260 265 270
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr
 275 280 285
 Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His Arg Cys Glu
 290 295 300 305
 Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn
 310 315 320
 Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly
 325 330 335 340
 Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys
 345 350 355 360

Gln Pro Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro
365 370 375
Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro
380 385 390 395
Ala Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
400 405 410
Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe
415 420 425 430
Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro
435 440 445 450
Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys Asp Ser Gly Lys Val Asp
455 460 465
Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr
470 475 480 485
Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val His Ser
490 495

配列番号 : 5

配列の長さ : 3 0

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (Ⅷ)

配列

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg

1 5 10 15

Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

20 25 30

配列番号 : 6

配列の長さ : 48

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (Td)

配列

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg

1 5 10 15

Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg

20 25 30 35

Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

40 45

配列番号 : 7

配列の長さ : 66

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (Td-3)

配列

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg
 1 5 10 15
 Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg
 20 25 30 35
 Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg
 40 45 50
 Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 55 60 65

配列番号 : 8

配列の長さ : 60

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (C2D)

配列

Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe
 1 5 10 15
 Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile
 20 25 30 35
 His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys
 40 45 50
 Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 55 60

配列番号：9

配列の長さ：160

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド (C2)

配列

Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala

20 25 30 35

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro

40 45 50

Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr

55 60 65 70

Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile

75 80 85 90

Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val

95 100 105

Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp

110 115 120 125

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln

130 135 140

Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

145

150

155

160

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 3 0

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (A1)

配列

Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe

1

5

10

15

Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu

20

25

30

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 3 9 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA (D1)

配列

ACTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGACT AAAGCAATAT CAGATGCACA GATTACTGCT 60

TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG ACTTCACCTC 120

CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG 180

GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACACTC AGGGAGTAA ATCTCTGCTT 240

ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC AAGATGGCCA TCAGTGGACT 300
CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA ATCAAGACTC CTTCACACCT 360
GTGGTGA ACT CTCTAGACCC ACCGTTACTG 390

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 9 0

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA (D1)

配列

CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA ATCAAGACTC CTTCACACCT 60
GTGGTGA ACT CTCTAGACCC ACCGTTACTG 90

配列番号 1 3

配列の長さ : 5 4

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA (D2)

配列

ACTCGCTACC TTCGMATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGG 54

但し、M はA 若しくはC。

配列番号 1 4

配列の長さ : 5 4

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA (D2)

配列

CTGCGCTACC TTCGMATTCA CCCCCAGACT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGG 54

但し、M はA 若しくはC。

配列番号 1 5

配列の長さ：3 6

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA (D3)

配列

ATGGAGGTTT TGGGTGCGA GGCACAGGAC CTCTAC 36

配列番号 1 6

配列の長さ：9 0

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA (VIII)

配列

ACTCGCTACC TTCGAATTCA CCCCCAGACT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG 60

GTTCTGGGCT GCGAGGCACA GGACCTCTAC 90

配列番号 : 17

配列の長さ : 144

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA (Td)

配列

```
ACTCGCTACC TTCGCATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGCTGCCG 60
TACCTTCGAA TTCACCCCCA GAGTTGGGTG CACCAGATTG CCCTGAGGAT GGAGGTTCTG 120
GGCTGCGAGG CACAGGACCT CTAC 144
```

配列番号 : 18

配列の長さ : 198

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA (Td-3)

配列

```
ACTCGCTACC TTCGCATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGCTGCCG 60
TACCTTCGCA TTCACCCCCA GAGTTGGGTG CACCAGATTG CCCTGAGGCT GCGCTACCTT 120
CGAATTCACC CCCAGAGTTG GGTGCACCAG ATTGCCCTGA GGATGGAGGT TCTGGGCTGC 180
GAGGCACAGG ACCTCTAC 198
```

配列番号 : 19

配列の長さ : 180

配列の型 : 核酸

配列の種類：cDNA to mRNA (C2D)

配列

CTCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA ATCAAGACTC CTCACACCT 60
GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC TTCGAATTCA CCCCAGAGT 120
TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA GGACCTCTAC 180

配列番号 2 0

配列の長さ：4 8 0

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA (C2)

配列

AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT CAGATGCACA GATTACTGCT 60
TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG ACTTCACCTC 120
CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG 180
GACTTCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAAC TACTC AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT 240
ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC AAGATGCCCA TCAGTGGACT 300
CTCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA ATCAAGACTC CTCACACCT 360
GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC TTCGAATTCA CCCCAGAGT 420
TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA GGACCTCTAC 480

i

配列番号：2 1

配列の長さ：1 4 9 1

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA (rsTM)

配列

GCTCCCGCAG AGCCGCAGCC GGGTGGCAGC CAGTGGCTCG AGCAGCACTG CTTCCGCCTC 60
TACCCGGGCC CCGCGACCTT CCTCAATGCC AGTCAGATCT GCGACGGACT GCGGGGGCAC 120
CTAATGACAG TGGCTCCTC GGTGGCTGCC GATGTCATTT CCTTGCTACT GAACGGGCAG 180
GGCGGCGTTG GCGCCCGCG CTTCTGGATC GGCCTGCAGC TGCCACCCCG CTGCGGGCAC 240
CCCAAGCGCC TCGGGCCCTT GCGCGGCTTC CAGTGGGTTA CGGGAGACAA CAACACCAGC 300
TATAGCAGGT GGGCAGCGCT CGACCTCAAT GGGGCTCCCC TCTGCGGCC CTTGTGCGTC 360
GCTGTCTCCG CTGCTGAGGC CACTGTGCCC AGCGAGCCGA TCTGGGAGGA GCAGCACTGC 420
GAAGTGAAGG CCGATGGCTT CCTCTGCGAG TTCCACTTCC CAGCCACCTG CAGGCCACTG 480
GCTGTGGAGC CCGGCGCCGC GGETGCCGCC GTCTCGATCA CCTACGGCAC CCCGTTGCG 540
GCCCCGGGAG CGGACTTCCA GCGCTGCCC GTGGGCAGCT CCGCCGCGGT GGCTCCCTC 600
GGCTTACAGC TAATGTGCAC CGCGCCGCC GGAGCGGTCC AGGGGCACTG GCGCAGGAG 660
GCGCCGGCG CTTGGGACTG CAGCGTGGAG AACGGCGCT GCGAGCAGC GTGCAATGCC 720
ATCCCTGGGG CTCCCCGCTG CCAGTGCCCA GCGGGCGCG CCCTGCAGGC AGACGGGCG 780
TCCTGCACCG CATCCGCGAC GCAGTCCTGC AACGACCTCT GCGAGCACTT CTGCGTTCCC 840
AACCCGACC AGCCGGGCTC CTAATCGTGC ATGTGCGAGA CCGGCTACCG GGTGGCGGCC 900
GACCAACACC GGTGCGAGGA CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCAGTCC GTGTCCGCAG 960
CGCTGTGTA ACACACAGG TGGCTTCGAG TGCCACTGCT ACCCTAACTA CGACCTGGTG 1020
GACGGCGAGT GTGTGAGCC CGTGGACCG TGCTTCAGAG CCAACTGCCA GTACCAGTGC 1080
CAGCCCTGA ACCAACTAG CTACCTCTGC GTCTGCGCG AGGGCTTCGC GCCCATTTCC 1140

CACGAGCCGC ACAGGTGCCA GATGTTTGC AACCAGACTG CCTGTCCAGC CGACTCCGAC 1200
 CCCAACACCC AGGCTAGCTG TGAGTGCCCT GAAGGCTACA TCCTGGACGA CGGTTTCATC 1260
 TGCACGGACA TCGACGAGTG CGAAAACGGC GGCTTCTGCT CCGGGGTGTG CCACAACCTC 1320
 CCCGGTACCT TCGAGTGCAT CTGCGGGCCC GACTCGGCCC TTGTCCGCCA CATTGGCACC 1380
 GACTGTGACT CCGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGCGGCT CTGGCGAGCC CCGCCCCAGC 1440
 CCGACGCCCG GCTCCACCTT GACTCCTCCG GCCGTGGGGC TCGTGCATTC G 1491

配列番号 : 2 2

配列の長さ : 3 6

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (T d D)

配列

Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg
1				5				10					15				
Leu	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg
				20			25				30					35	

配列番号 : 2 3

配列の長さ : 6 8

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (U T I 第二領域)

配列

Ala Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu
 1 5 10 15
 Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly Gly Cys
 20 25 30 35
 Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg Glu Tyr Cys Gly
 40 45 50
 Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu Leu Leu Arg Phe Ser Asn
 55 60 65

配列番号 : 2 4

配列の長さ : 1 4 7

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (r U T I)

配列

Ala Val Leu Pro Gln Glu Glu Glu Gly Ser Gly Gly Gly Gln Leu Val Thr Glu
 1 5 10 15
 Val Thr Lys Lys Glu Asp Ser Cys Gln Leu Gly Tyr Ser Ala Gly Pro Cys Met
 20 25 30 35
 Gly Met Thr Ser Arg Tyr Phe Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Cys Glu Thr Phe
 40 45 50
 Gln Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr Glu Lys Glu Cys
 55 60 65 70

Leu Gln Thr Cys Arg Thr Val Ala Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pro
 75 80 85 90

Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val
 95 100 105

Leu Phe Pro Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys
 110 115 120 125

Glu Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro Gly Asp Gly Asp Glu Glu Leu Leu Arg
 130 135 140

Phe Ser Asn

145

配列番号 : 2 5

配列の長さ : 2 7 9

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド (r . s M C P)

配列

Cys Glu Glu Pro Pro Thr Phe Glu Ala Met Glu Leu Ile Gly Lys Pro Lys Pro
 1 5 10 15

Tyr Tyr Glu Ile Gly Glu Arg Val Asp Tyr Lys Cys Lys Lys Gly Tyr Phe Tyr
 20 25 30 35

Ile Pro Pro Leu Ala Thr His Thr Ile Cys Asp Arg Asn His Thr Trp Leu Pro
 40 45 50

Val Ser Asp Asp Ala Cys Tyr Arg Glu Thr Cys Pro Tyr Ile Arg Asp Pro Leu
 55 60 65 70
 Asn Gly Gln Ala Val Pro Ala Asn Gly Thr Tyr Glu Phe Gly Tyr Gln Met His
 75 80 85 90
 Phe Ile Cys Asn Glu Gly Tyr Tyr Leu Ile Gly Glu Glu Ile Leu Tyr Cys Glu
 95 100 105
 Leu Lys Gly Ser Val Ala Ile Trp Ser Gly Lys Pro Pro Ile Cys Glu Lys Val
 110 115 120 125
 Leu Cys Thr Pro Pro Pro Lys Ile Lys Asn Gly Lys His Thr Phe Ser Glu Val
 130 135 140
 Glu Val Phe Glu Tyr Leu Asp Ala Val Thr Tyr Ser Cys Asp Pro Ala Pro Gly
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Phe Ser Leu Ile Gly Glu Ser Thr Ile Tyr Cys Gly Asp Asn Ser
 165 170 175 180
 Val Trp Ser Arg Ala Ala Pro Glu Cys Lys Val Val Lys Cys Arg Phe Pro Val
 185 190 195
 Val Glu Asn Gly Lys Gln Ile Ser Gly Phe Gly Lys Lys Phe Tyr Tyr Lys Ala
 200 205 210 215
 Thr Val Met Phe Glu Cys Asp Lys Gly Phe Tyr Leu Asp Gly Ser Asp Thr Ile
 220 225 230
 Val Cys Asp Ser Asn Ser Thr Trp Asp Pro Pro Val Pro Lys Cys Leu Lys Gly
 235 240 245 250

Pro Arg Pro Thr Tyr Lys Pro Pro Val Ser Asn Tyr Pro Gly Tyr Pro Lys Pro
 255 260 265 270

Glu Glu Gly Ile Leu Asp Ser Leu Asp
 275

配列番号 : 2 6

配列の長さ : 1 0 8

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA (T d D)

ACTCGCTACC TTCGCATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGCTGCCG 60
 TACCTTCGAA TTCACCCCA GAGTTGGTG CACCAGATTG CCCTGAGG 108

配列番号 : 2 7

配列の長さ : 2 0 4

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA (U T I 第二領域)

GCGGCCTGCA ATCTCCCAT AGTCCGGGC CCCTGCCGAG CCTTCATCCA GCTCTGGGCA 60
 TTTGATGCTG TCAAGGGGAA GTGCGTCCTC TTCCCTACG GGGGCTGCCA GGGCAACGGG 120
 AACAAGTTCT ACTCAGAGAA GGAGTGCAGA GAGTACTGCG GTGTCCCTGG TGATGGTGAT 180
 GAGGAGCTGC TGGCCTTCTC CAAC 204

配列番号 : 2 8

配列の長さ : 4 4 1

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA (rUTI)

```
GCTGTGCTAC CCCAAGAAGA GGAAGGATCA GGGGGTGGGC AACTGGTAAC TGAAGTCACC 60
AAGAAAGAAG ATTCCTGCCA GCTGGGCTAC TCGGCCGGTC CCTGCATGGG AATGACCAGC 120
AGGTATTTCT ATAATGTAC ATCCATGGCC TGTGAGACTT TCCAGTACGG CGGCTGCATG 180
GGCAACGGTA ACAACTTCGT CACAGAAAAG GAGTGTCTGC AGACCTGCCG AACTGTGGCG 240
GCCTGCAATC TCCCCATAGT CCGGGGCCCC TGGCGAGCCT TCATCCAGCT CTGGGCATTT 300
GATGCTGTCA AGGGGAAGTG CGTCTCTTC CCCTACGGG GCTGCCAGGG CAACGGGAAC 360
AAGTTCTACT CAGAGAAGGA GTGCAGAGAG TACTGCGGTG TCCCTGGTGA TGGTGATGAG 420
GAGCTGCTGC GCTTCTCCAA C 441
```

配列番号 : 2 9

配列の長さ : 8 3 7

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA (rsMCP)

```
TGTGAGGA GCCACCAACA TTTGAAGCTA TGGAGCTCAT TGCTAAACCA AAACCCTACT 58
ATGAGATTGG TGAACGAGTA GATTATAAGT GTAAAAAGG ATACTTCTAT ATACCTCCTC 118
TTGCCACCCA TACTATTTGT GATCGGAATC ATACATGGCT ACCTGTCTCA GATGACGCCT 178
GTTATAGAGA AACATGTCCA TATATACGGG ATCCTTTAAA TGGCCAAGCA GTCCCTGCAA 238
ATGGGACTTA CGAGTTTGGT TATCAGATGC ACTTTATTG TAATGAGGGT TATTACTTAA 298
TTGGTGAAGA AATTCTATAT TGTGAACCTA AAGCATCACT AGCAATTGG AGCGGTAAGC 358
```

CCCCAATATG TGAAGGTT TGTGTACAC CACCTCCAAA AATAAAAAAT GGAAACACA 418
CCTTTAGTGA AGTAGAAGTA TTGAGTATC TTGATGCAGT AACTTATAGT TGTGATCCTG 478
CACCTGGACC AGATCCATTT TCACTTATTG GAGAGAGCAC GATTTATTGT GGTGACAATT 538
CAGTGTGGAG TCGTGCTGCT CCAGAGTGT AAGTGGTCAA ATGTCGATTT CCAGTAGTCG 598
AAAATGGAAA ACAGATATCA GGATTGGAA AAAAATTTTA CTACAAAGCA ACAGTTATGT 658
TTGAATGCCA TAAGGGTTTT TACCTCGATG GCAGCGACAC AATTGCTGT GACAGTAACA 718
GTACTTGGGA TCCCCAGTT CCAAAGTGT TTAAGGTCC TAGGCCTACT TACAAGCCTC 778
CAGTCTCAA TTATCCAGGA TATCCTAAAC CTGAGGAAGG AATACTTGAC AGTTTGGAT 837

請求の範囲

1. リン脂質に親和性を有する物質と生理活性物質とを含有する薬剤。
2. 前記リン脂質が細胞表層を形成する脂質二重層の構成成分に含まれるリン
- 5 脂質であることを特徴とする請求項 1 に記載の薬剤。
3. 前記リン脂質が細胞が正常でない時に細胞表層を形成する脂質二重層の外層に含まれる割合が増加するリン脂質であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の薬剤。
4. 前記リン脂質がホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールア
- 10 ミンである請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の薬剤。
5. 前記リン脂質がホスファチジルセリンである請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の薬剤。
6. 前記リン脂質に親和性を有する物質が下記の一般式で表わされる配列を有する請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の薬剤。
- 15
$$(A1)n_1 - (A2)n_2 - (A3)n_3$$

(ただし、A 1 は配列番号 1 または配列番号 10 に記載のアミノ酸配列、A 2 及び A 3 はそれぞれ配列番号 2 及び配列番号 3 に記載のアミノ酸配列、 n_1 、 n_2 及び n_3 はそれぞれ A 1、A 2 及び A 3 の繰り返し回数であってそれぞれ 0 ～ 5、1 ～ 5 及び 0 ～ 5 である。)
- 20 7. 前記 n_1 が 0 または 1、 n_2 が 1、2 または 3、 n_3 が 0 または 1 である請求項 6 に記載の薬剤。
8. 前記リン脂質に親和性を有する物質が下記のいずれかの配列を有する請求

項 6 または請求項 7 に記載の薬剤。

(A 1)₁ - (A 2)₁ - (A 3)₁

(A 2)₁ - (A 3)₁

(A 2)₂ - (A 3)₁

5

(A 2)₃ - (A 3)₁

(A 2)₂

9. 前記リン脂質に親和性を有する物質が下記のいずれかの配列を有する請求項 6 ～ 8 のいずれかに記載の薬剤。

(A 2)₂ - (A 3)₁

10

(A 2)₃ - (A 3)₁

(A 2)₂

10. 前記生理活性物質がペプチドである請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の薬剤。

11. 前記ペプチドが血液凝固反応系に関与する因子、線溶系に関与する因子

15. 免疫応答反応に関与する因子、細胞障害を抑制する因子及び蛋白分解酵素の活性を阻害する因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 10 に記載の薬剤。

12. 前記ペプチドが血液凝固反応を抑制する因子、線溶系を亢進する因子、補体活性化反応を抑制する因子、活性酸素による細胞障害を抑制する因子及び蛋白

20. 分解酵素の活性を阻害する因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 10 に記載の薬剤。

13. 前記ペプチドがトロンボモジュリン (TM)、ウリナスタチン

(U T I) の第二領域、メンブレンコファクタープロテイン (Membrane Cofactor Protein、MCP)、U T I またはそれらの改変体である請求項 10～12 のいずれかに記載の薬剤。

14. 前記ペプチドが配列番号 4 または配列番号 23～25 のいずれかに記載の
5 のアミノ酸配列を有する請求項 10～13 のいずれかに記載の薬剤。

15. 前記生理活性物質とリン脂質に親和性を有する物質とがペプチド結合を介して結合する請求項 10～14 のいずれかに記載の薬剤。

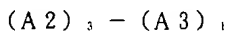
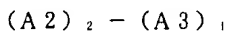
16. 前記リン脂質に親和性を有する物質の N 末端アミノ酸と生理活性物質の C 末端アミノ酸とがペプチド結合を介して結合している請求項 10～15 のい
10 づれかに記載の薬剤。

17. 下記の一般式で表されるアミノ酸配列を有するペプチド。



(ただし、A2 及び A3 はそれぞれ配列番号 2 及び配列番号 3 に記載のアミノ酸配列であって、 n_2 及び n_3 はそれぞれ A2 及び A3 の繰り返し回数を表し、そ
15 れぞれ 2 または 3 及び 0 または 1 である。)

18. 前記アミノ酸配列が下記のいずれかの配列を有する請求項 17 に記載のペプチド



20 $(A2)_2$

19. 請求項 15 または 16 に記載の薬剤のいずれかのアミノ酸配列をコードする DNA。

20. 請求項17または18に記載のペプチドのいずれかのアミノ酸配列をコードするDNA。

21. 請求項1～16のいずれかに記載の薬剤の製造方法。

FIG. 1

S 1 : TTGTCGACAT GCTTGGGGTC CTGGTCCTT

S 2 : ATAAGCTTCC GCTGCTGAGG CCACTGTGC

S 3 : TTCTGCAGCT CGAGCCCGTG GACCCGTGC TTC

S 4 : GCATTGCGAG CACTCTTCGC ATGG

S 5 : AAAATGCATT CGAGTTGCAG CATGCCATTG GGAATGG

S 6 : AAAATGCATT CGCTCTTTT TCAGAATGGC AAAGTAAAGG

S 7 : TTGAAGCTTA TGAGGAGCCT CGGGGCCCTG CTCTTGCTG

S 8 : GCTCTAGAAT GAGGAGCCTC GGGGCCCTGC TCTTGCTGCT GAGCGCCTGC CTGGCGGTGA
CGCTGCTGT GCTACCCCAA GAAGAGGAAG

S 9 : AAAGTGCAGA GAGTACTGCG GTGTCCCTGG TGATGGTGAT GAGGAGCTGC TGCGCTTCTC
CAACAGTTGC AGCATGCCAT TGGGAATGG

FIG. 2

A 1 : TTGGATCCCA CAGTGGCCTC AGCAGCGGA

A 2 : ATGTCGACAC ACTCGCCGTC CACCAGGTC

A 3 : AGAATTCGGA TCCTCAGAGT CTCTGCCGCC TCCGCTC

A 4 : GATAGTTAAT TCAGGAGGCT TC

A 5 : AAAAGAATTC TCGAGTCAGT AGAGGTCCTG TGCCTCGCAG CCCAGAACC

A 6 : CGCGGATCCT CAGTTGGAGA AGCGCAGCAG CTCCTCATC

A 7 : ATAAGAATGC GGCCGCTCAG TTGGAGAAGC GCAGCAGCTC CTC

A 8 : TTTGCCGCCG CTCAGTAGAG GTCCTGTGCC TCGC

FIG. 3

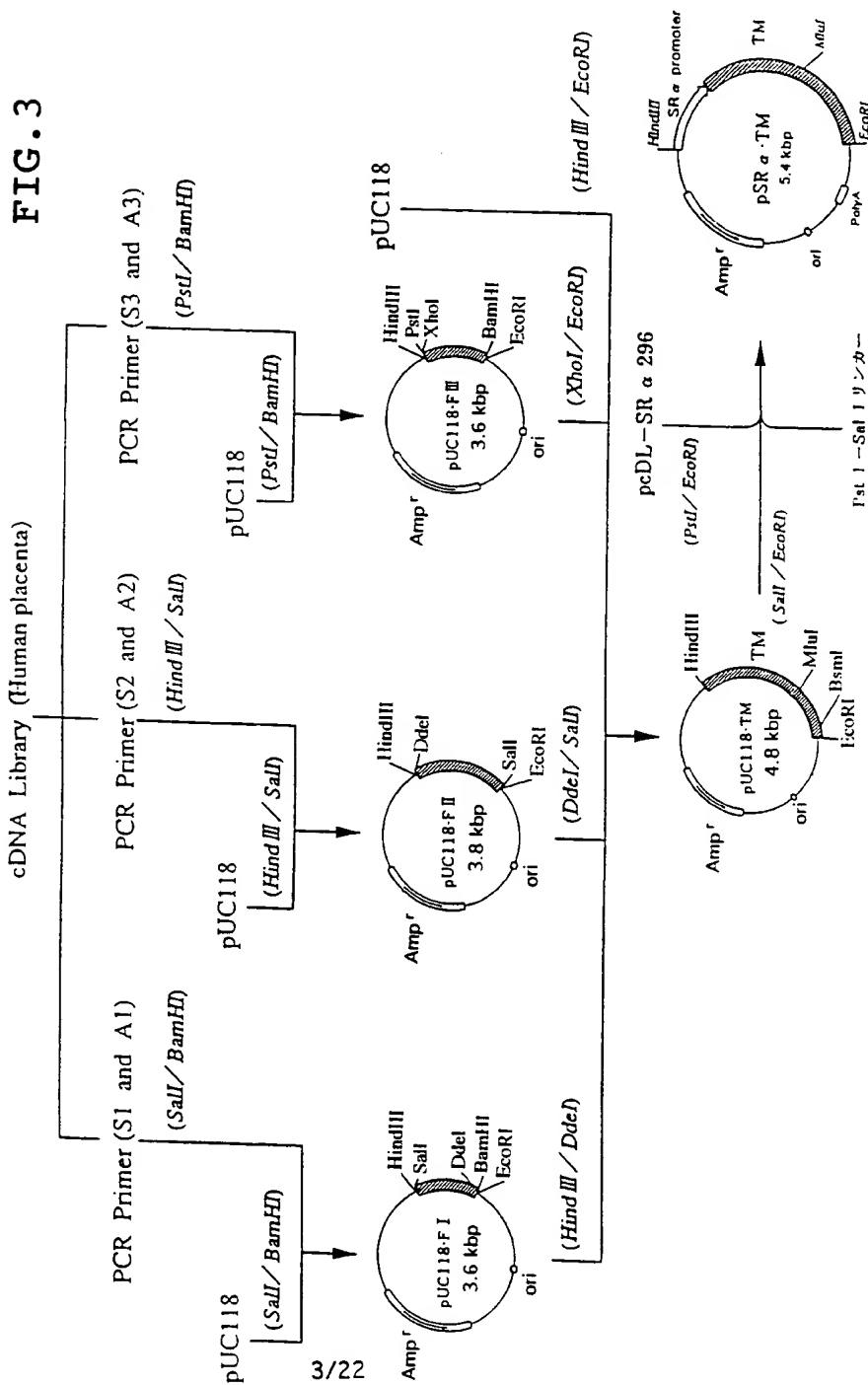


FIG. 4

F 1 : CATTGACTC GCTACCTCG AACTCGAG

F 2 : AATTCTCGAG TTCGAAGGTA GCGAGTCGAA TGCA

F 3 : CGAATTCACC CCCAGAGTTG GGTGCACCAG ATTGCCCTGA GGATGGAGGT TCTGGGCTGC
GAGGCACAGG ACCTCTACTG AGGTACCG

F 4 : AATTCGGTAC CTCAGTAGAG GTCCTGTGCC TCGCAGCCCA GAACCTCCAT CCTCAGGGCA
ATCTGGTGCA CCCAACTCTG GGGGTGAATT

F 5 : CGCATTACCC CCCAGAGTTG GGTGCACCAG ATTGCCCTGA GGCTGCGCTA CCTTCGAAGC
TTG

F 6 : AATTCAAGCT TCGAAGGTAG CGCAGCCTCA GGGCAATCTG GTGCACCCAA CTCTGGGGGT
GAATG

F 7 : CGAATTCACC CCCAGAGTTG GGTGCACCAG ATTGCCCTGA GGATGGAGGT TCTGGGCTGC
GAGGCACAGG ACCTCTACTG AGGTACCG

F 8 : AATTCGGTAC CTCAGTAGAG GTCCTGTGCC TCGCAGCCCA GAACCTCCAT CCTCAGGGCA
ATCTGGTGCA CCCAACTCTG GGGGTGAATT

F 9 : CGAATTCACC CCCAGAGTTG GGTGCACCAG ATTGCCCTGA GGTGAGGTAC CG

F 1 0 : AATTCGGTAC CTCACCTCAG GGCAATCTGG TGCACCCAAC TCTGGGGGTG AATT

FIG. 5

F 1 1 : CATTGCTGAG

F 1 2 : AATTCTCAGC AATGCA

F 1 3 : AATTCAGCGC TGTGCAGAGA GTACTGCGGT GTCCCTGCAT GCGCATTAG GACCTGGTAC
CGCGGCCGCA

F 1 4 : AGCTTGCGGC CGCGGTACCA GGTCCCTGAAT GCGCATGCAG GGACACCGCA GTACTCTCTG
CACAGCGCTG

F 1 5 : GCTGCTGTGC TACCCCAAGA AGAGGAAGGA GATGGGGCGG CCTGCAATCT CCCCATAGTC
CGGGGCC

F 1 6 : CCGGACTATG GGGAGATTGC AGGCCGCCCC ATCTCCTTCC TCTTCTTGGG GTAGCACAGC
AGC

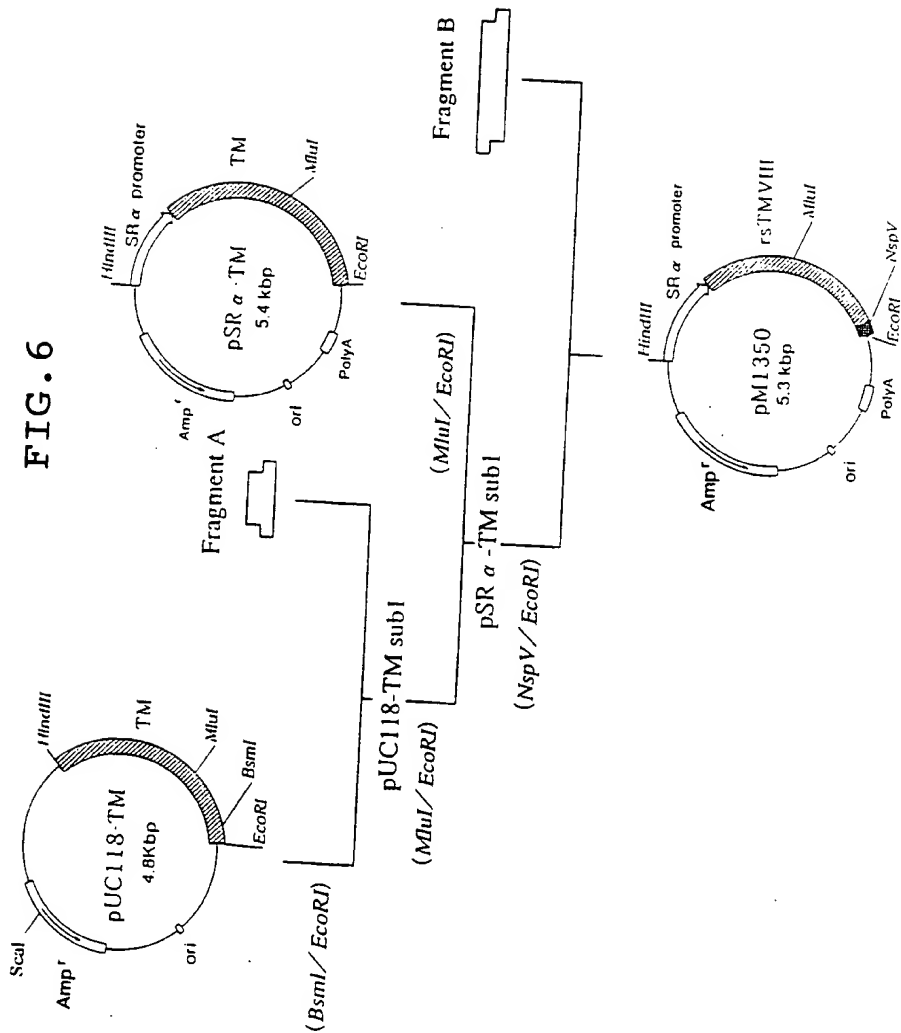
F 1 7 : TGAGGAAGGA ATACTTGACA GTTTGAGTTG CAGCATGCAA AATTCGAAAA AAGGTACCA

F 1 8 : AGCTTGGTAC CTTTTTTCGA ATTTTGCATG CTGCAACTCA AACTGTCAAG TATTCCTTCC

F 1 9 : CGAATCCACC CCCAGAGTTG GGTGCACCAG ATTGCCCTGA GGATGGAGGT TCTGGGCTGC
GAGGCACAGG ACCTCTACTG AAGCTTGGTA C

F 2 0 : CAAGCTTCAG TAGAGGTCTT GTGCCTCGCA GCCCAGAACC TCCATCCTCA GGGCAATCTG
GTGCACCCAA CTCTGGGGGT GGATT

FIG. 6



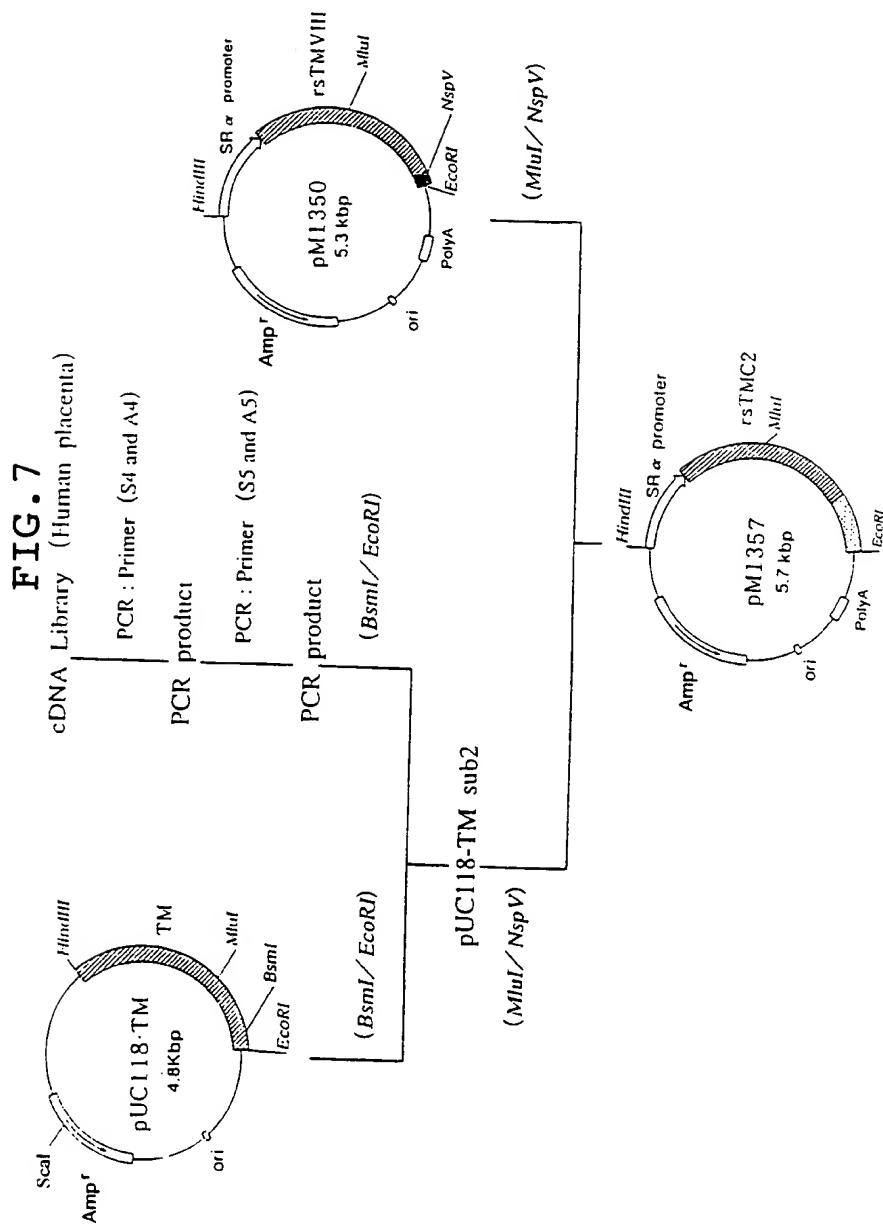


FIG. 8

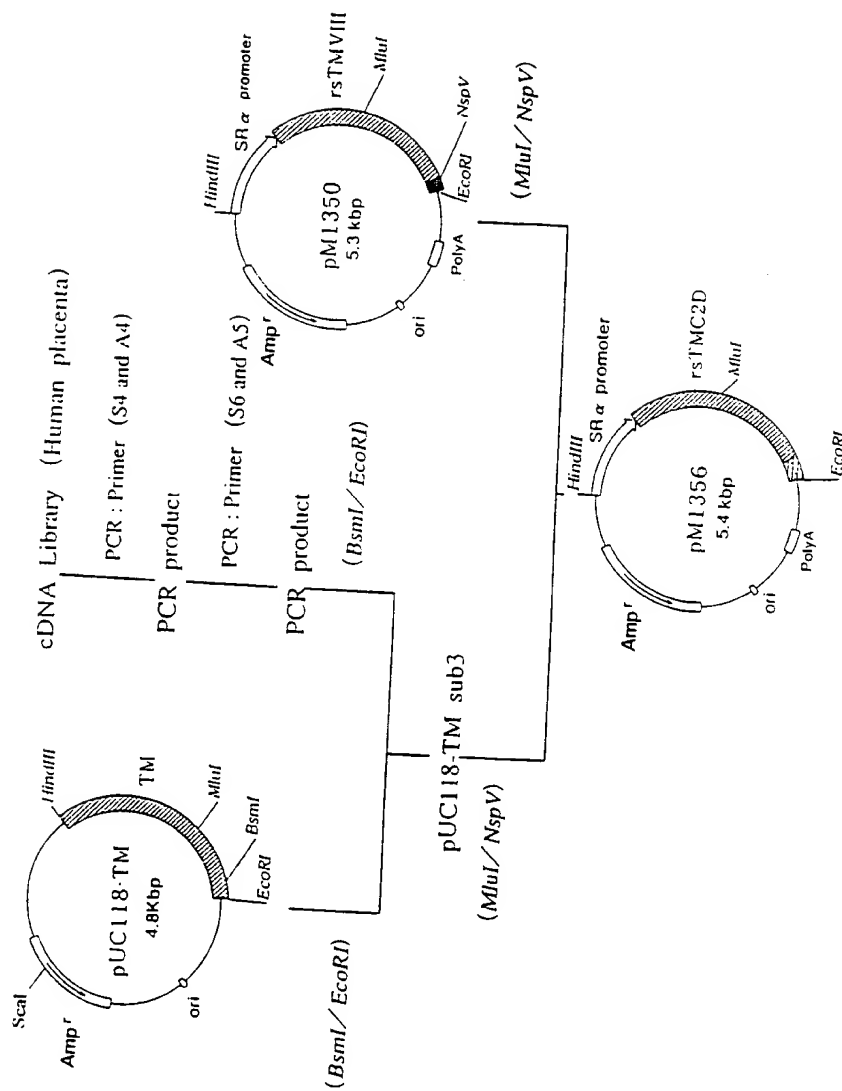


FIG. 9

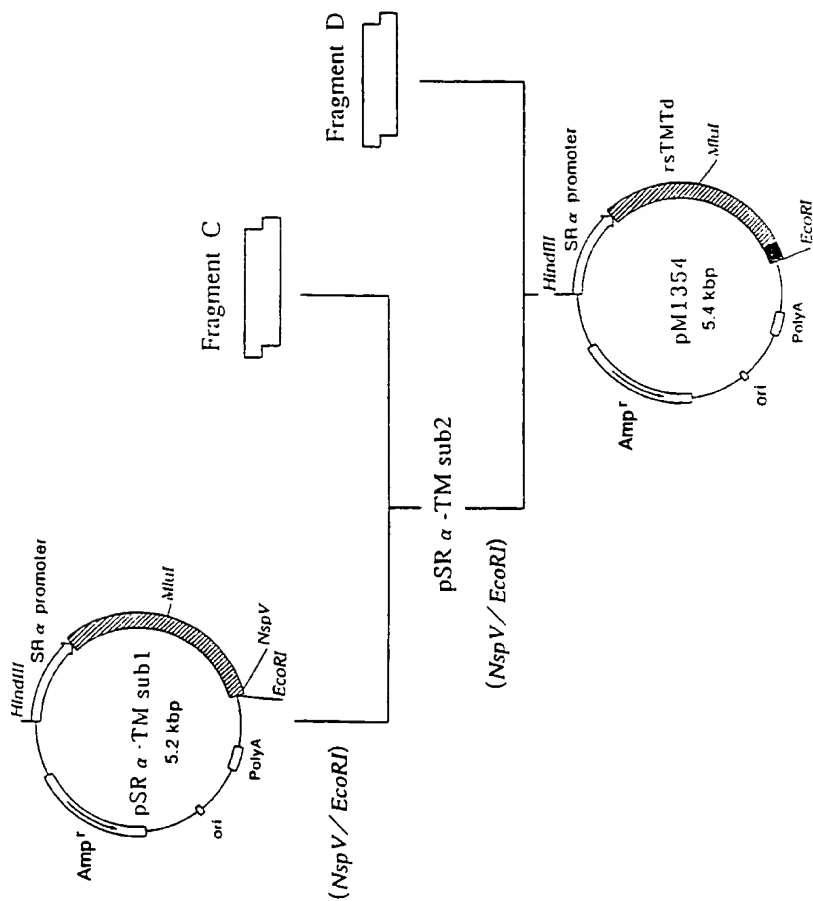


FIG. 10

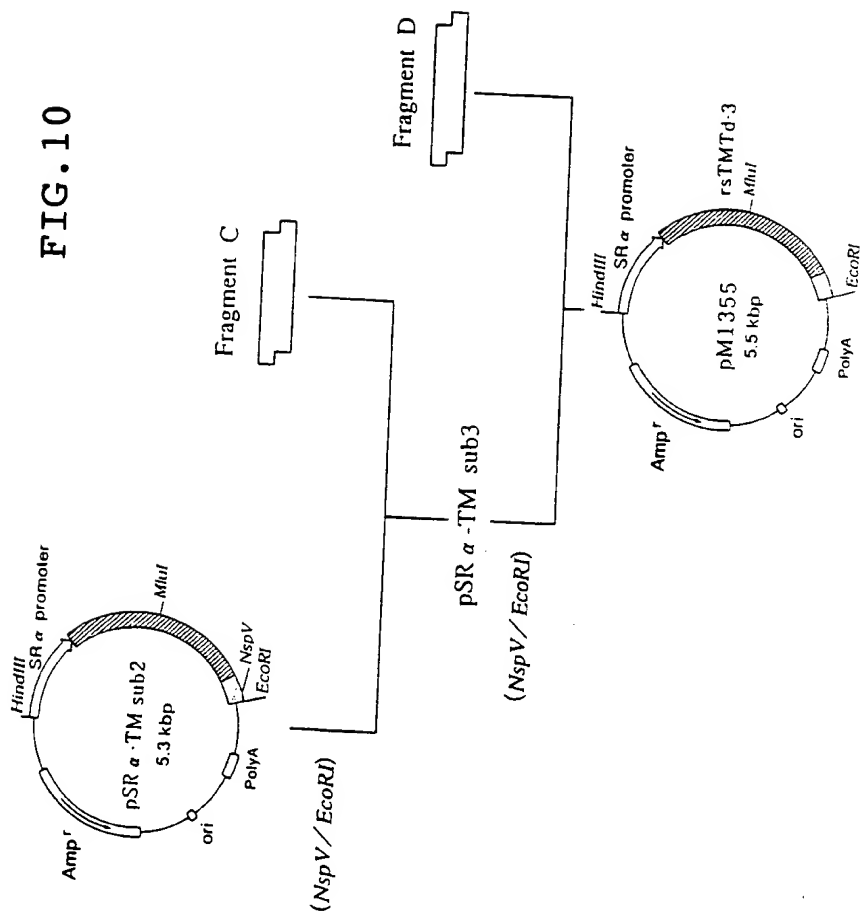


FIG. 11

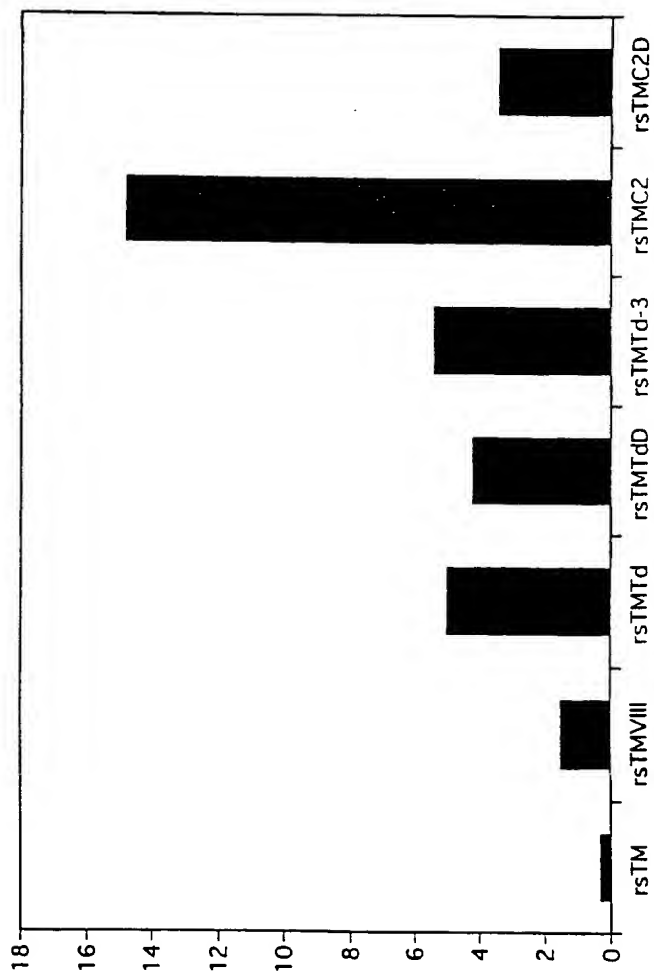


FIG. 12

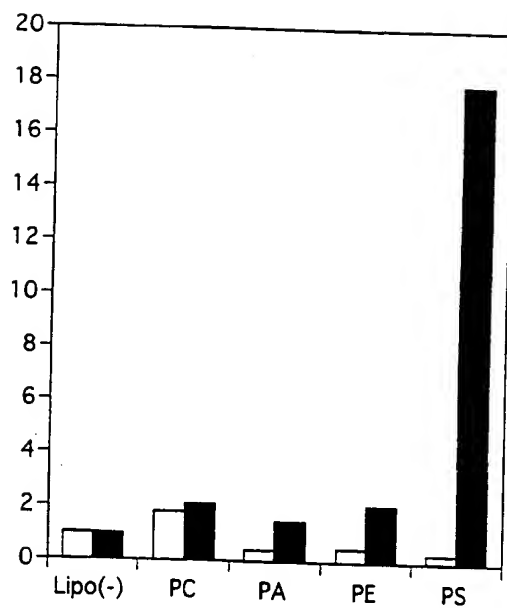


FIG. 13

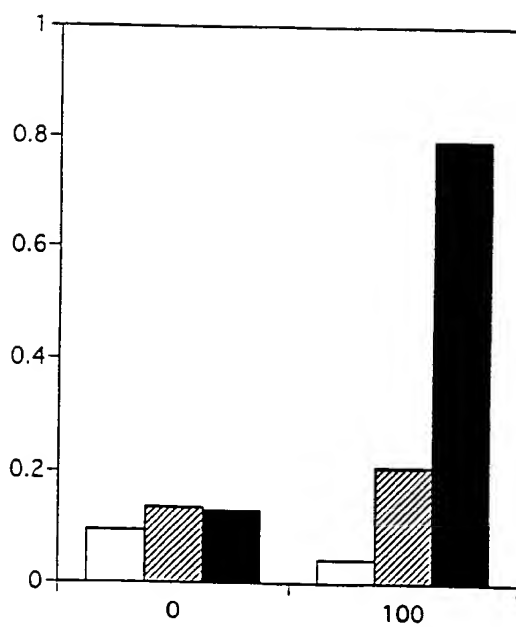
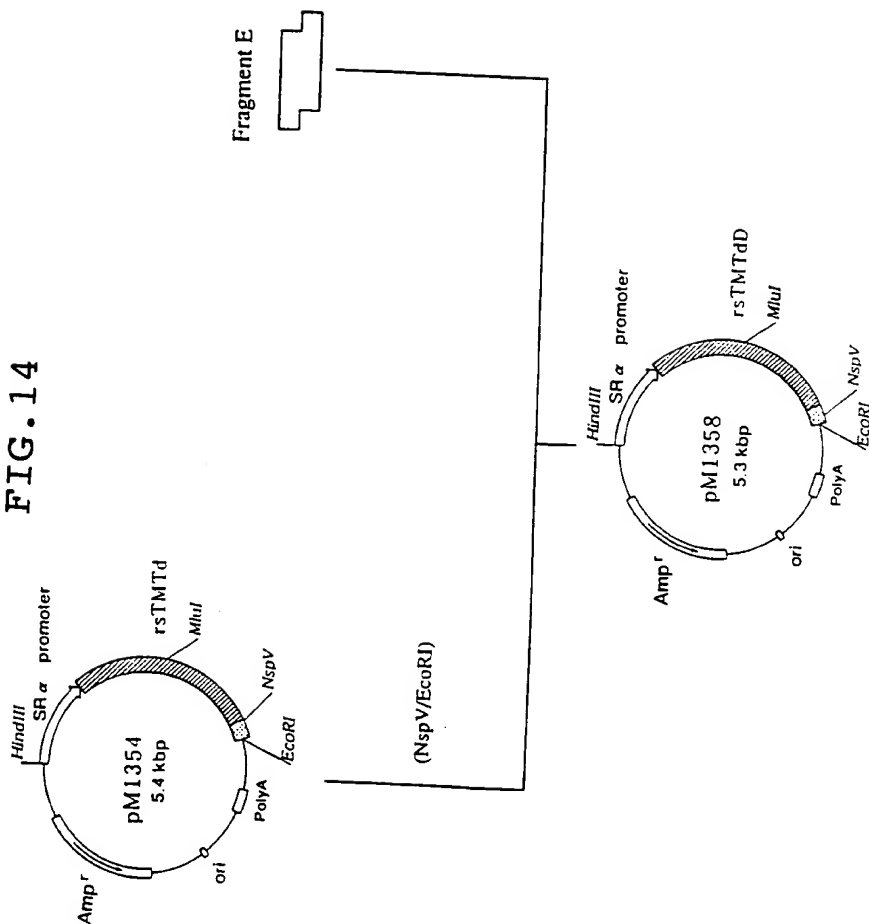


FIG. 14



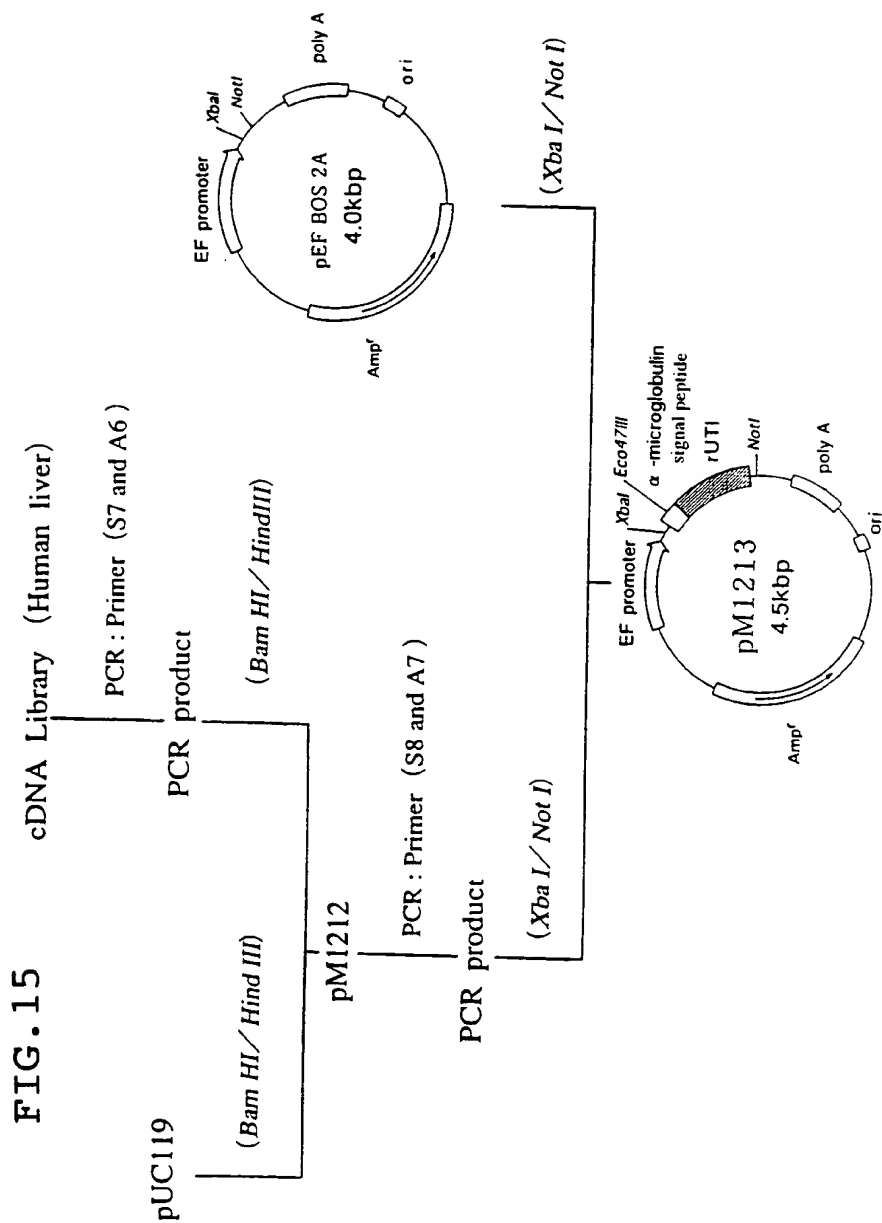


FIG. 16

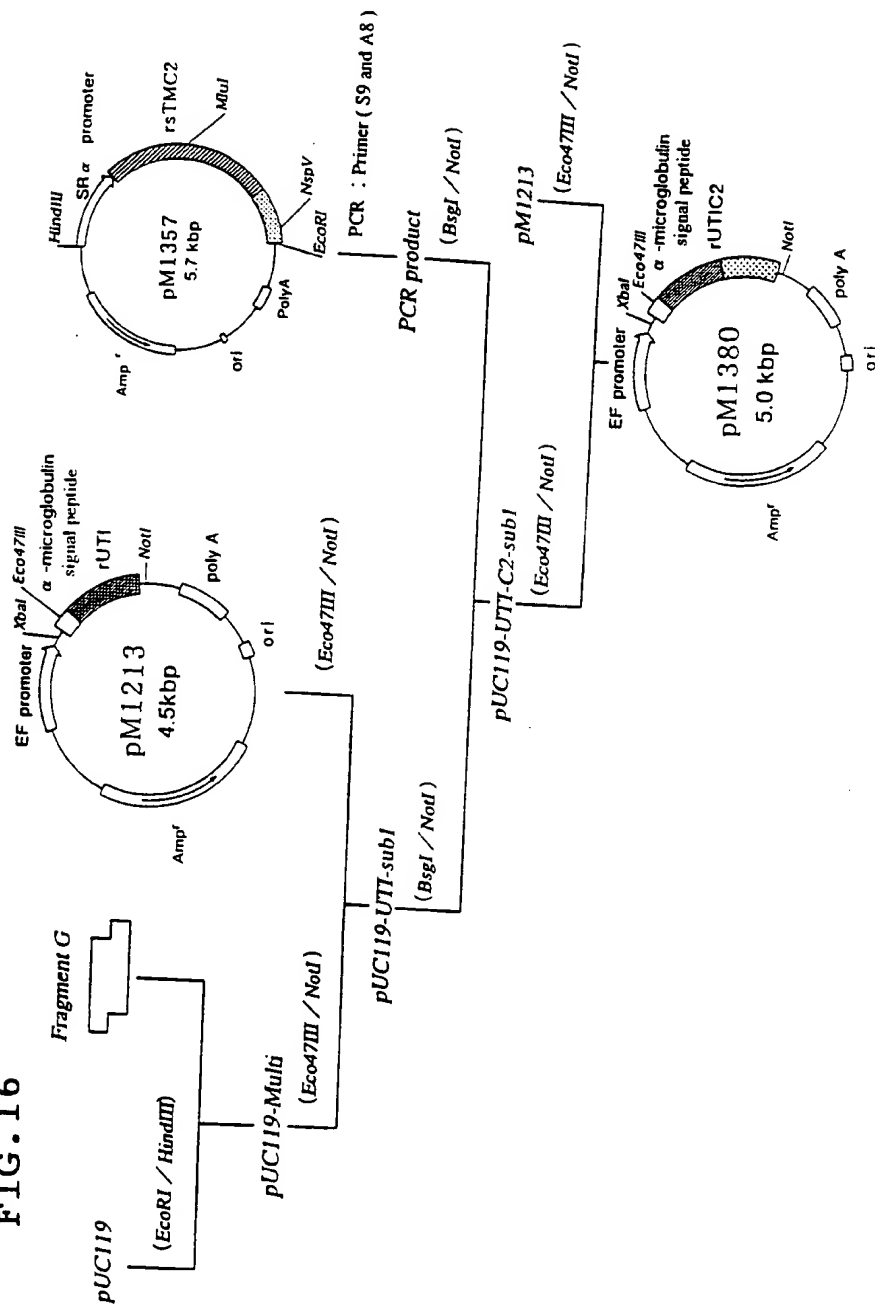


FIG. 17

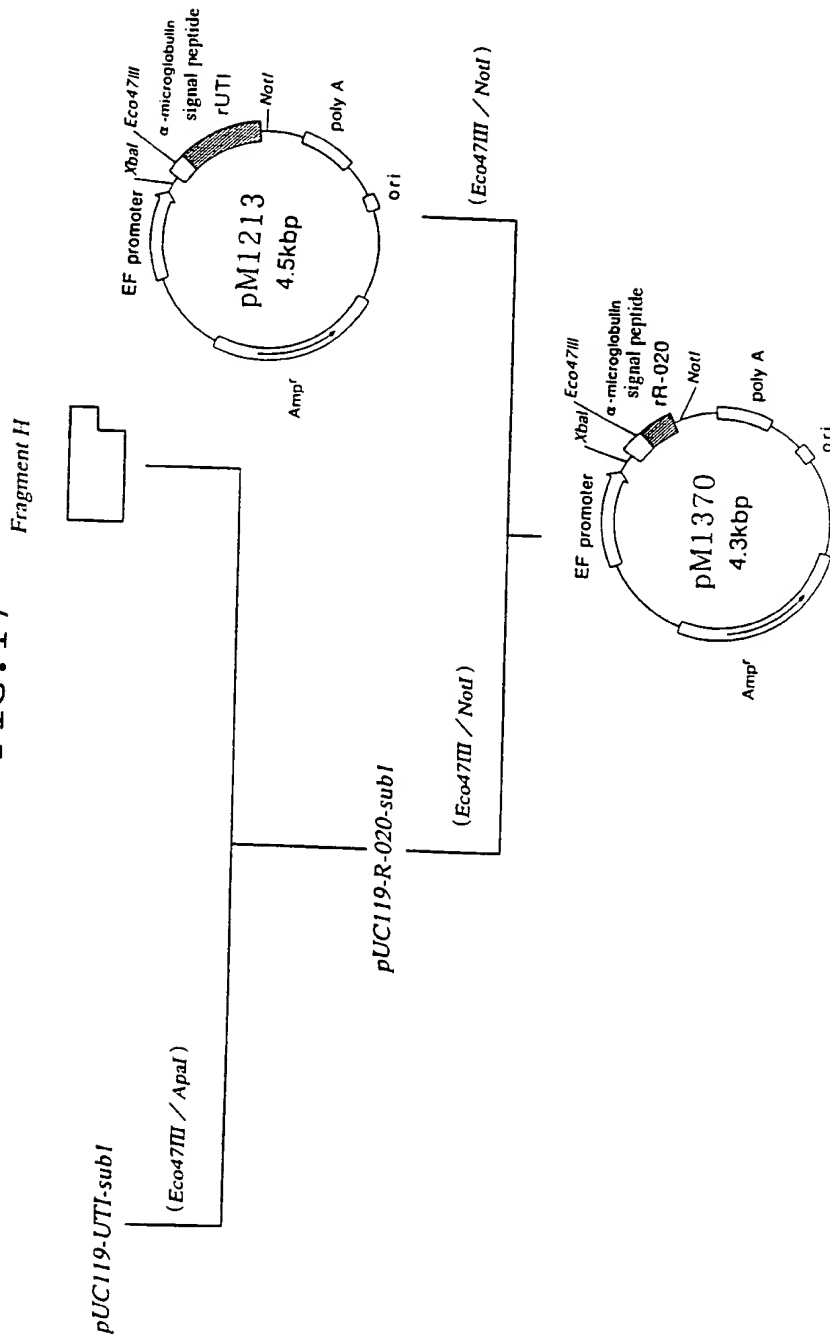


FIG. 18

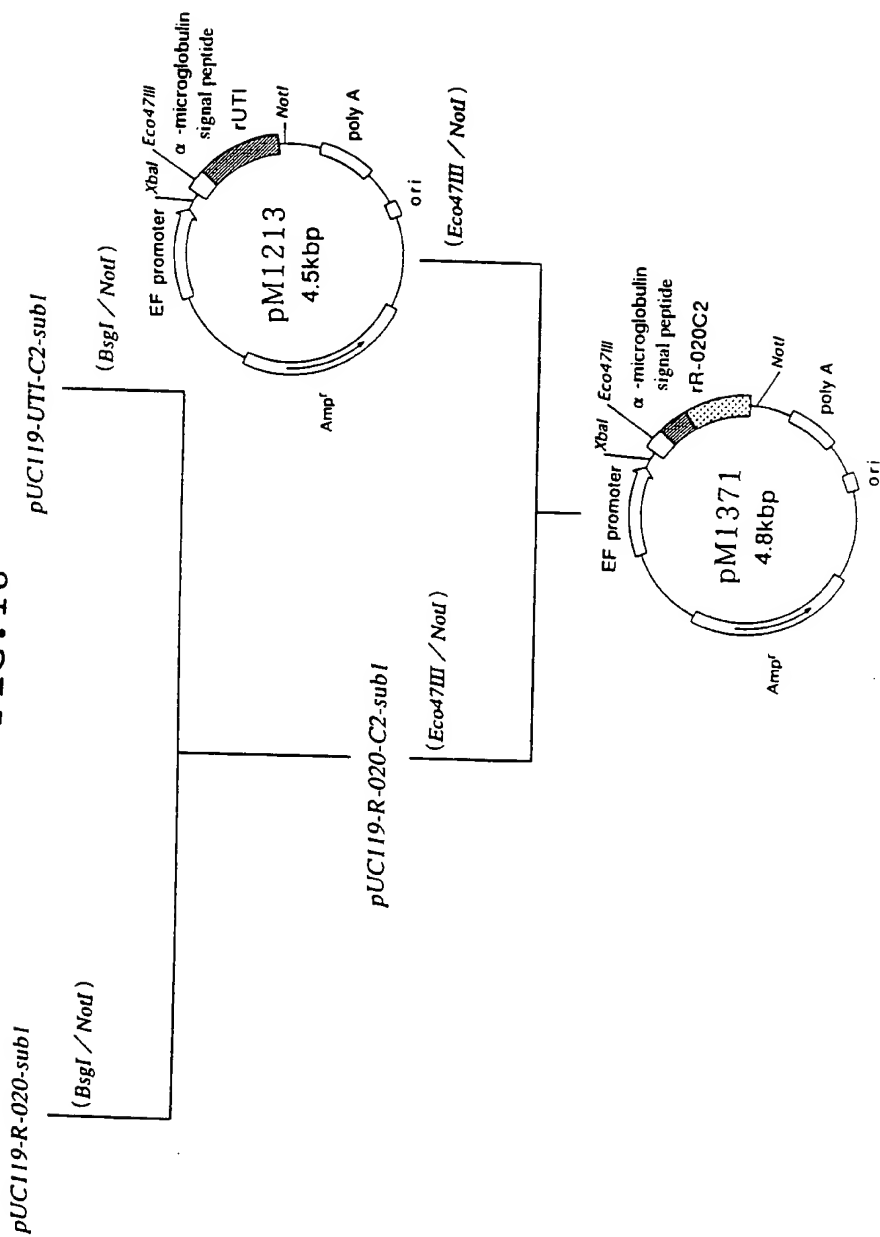


FIG. 19

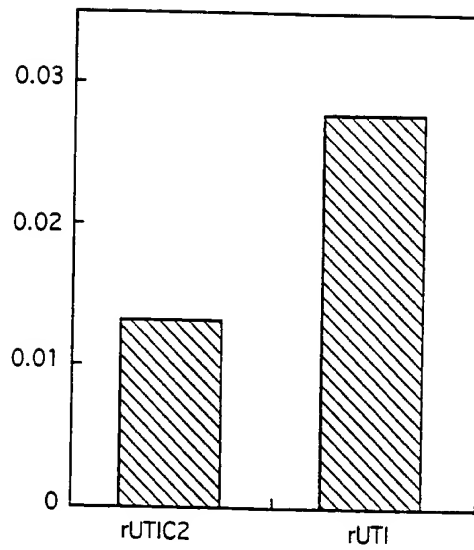


FIG.20

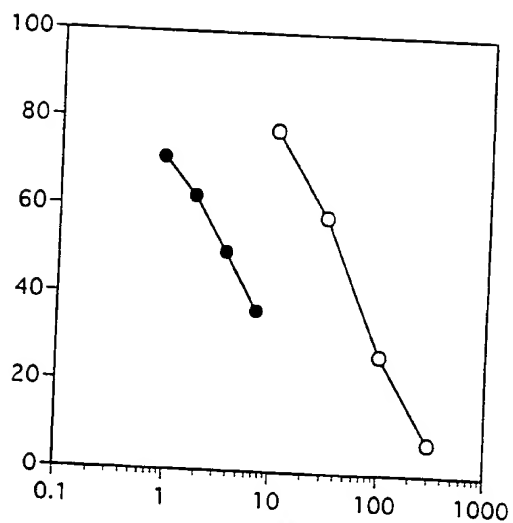


FIG. 21

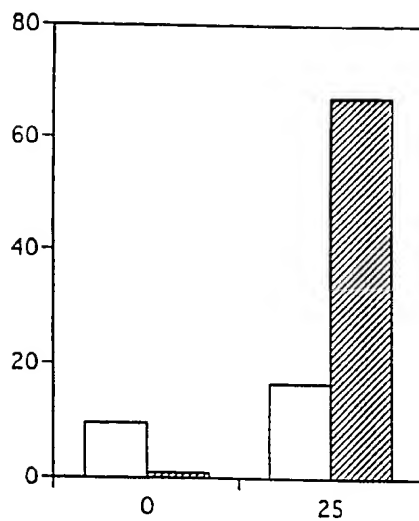
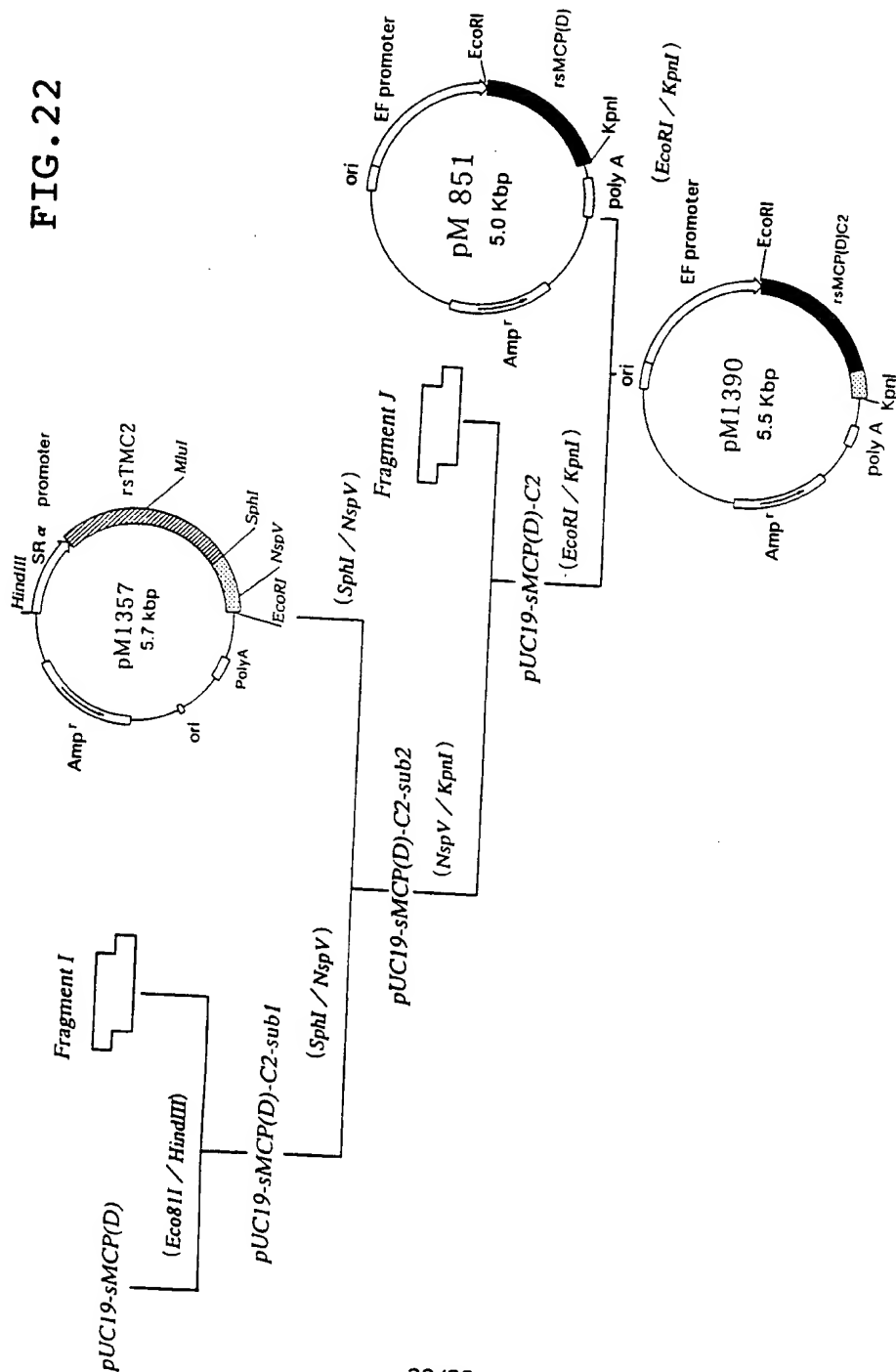


FIG. 22



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K19/00, C07K14/745, A61K47/48, C12P21/02, C12N15/12 //
(C12P21/02, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K19/00, C07K14/745, A61K47/48, C12P21/02, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Biochemistry, 34, 1995, Gary E. Gilbert et al., "Membrane-binding peptide from the C2 domain of factor VIII forms an amphipatic structure as determined by NMR spectroscopy" p.3022-3031	1-21
A	WO, 93/17122, A (MOCHIDA PHARM CO LTD), September 2, 1996 (02. 09. 96) & JP, 5-271288, A & EP, 581967, A	10-16, 19, 21
A	JP, 9-20677, A (MOCHIDA PHARM CO LTD), January 21, 1997 (21. 01. 97) (Family: none)	10-16, 19, 21
A	WO, 92/03149, A (SCHERING AG), March 5, 1992 (05. 03. 92) & EP, 544826, A & US, 5466668, A	10-16, 19, 21
A	WO, 88/05053, A (ASAHI KASEI KOGYO KK), July 14, 1988 (14. 07. 88) & JP, 1-6219, A & EP, 312598, A	10, 11, 15, 16, 19, 21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
--	---

Date of the actual completion of the international search
April 8, 1998 (08. 04. 98)

Date of mailing of the international search report
April 21, 1998 (21. 04. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00002

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 91/02002, A (UNIV WASHINGTON), March 11, 1991 (11. 03. 91) & EP, 483247, A & US, 5514787, A & JP, 5-501398, A	10-16, 19, 21
X	EP, 253455, A (GIST-BROCADES N.V.), January 20, 1988 (20. 01. 88) & JP, 63-313587, A	1-7, 10-12, 19, 21
A	Biochemistry, 26, 1987, Wen Duanzhi et al., "Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene" p.4350-4357	10-16, 19, 21
A	Nippon Yakurigaku Zasshi, 88, 1986, Nakayama K. et al., "Effects of urinastatin on energy metabolism disorder during shock" p.195-203	10-16, 19, 21
A	EP, 383599, A (MERCK & CO INC), August 22, 1990 (22. 08. 90) & JP, 7-278200, A & WO, 90/00758, A	1-21
A	WO, 88/09343, A (CENTRAL GRASS CO LTD), December 1, 1988 (01. 12. 88) & US, 5095096, A & EP, 317641, A & JP, 63-504508, A	1-21
A	JP, 7-509227, A (UNIV OREGON HEALTH SCI), October 12, 1995 (12. 10. 95) & US, 5256641, A & EP, 650371, A & WO, 94/01138, A	1-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/00002

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^{*} C07K19/00, C07K14/745, A61K47/48, C12P21/02, C12N15/12 // (C12P21/02, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^{*} C07K19/00, C07K14/745, A61K47/48, C12P21/02, C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Biochemistry, 34, 1995, Gary E. Gilbert et al. 「Membrane-binding peptide from the C2 domain of factor VIII forms an amphipathic structure as determined by NMR spectroscopy」 p. 3022-3031	1-21
A	WO, 93/17122, A (MOCHIDA PHARM CO LTD) 2. 9月. 1996 (02. 09. 96) & JP, 5-271288, A & EP, 581967, A	10-16, 19, 21
A	JP, 9-20677, A (MOCHIDA PHARM CO LTD) 21. 1月. 1997 (21. 01. 97) (Family:none)	10-16, 19, 21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 04. 98

国際調査報告の発送日

21.04.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中美奈子



4 B 9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

様式 PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 92/03149, A (SCHERING AG) 5. 3月. 1992 (05. 03. 92) & EP, 544826, A & US, 5466668, A	10-16, 19, 21
A	WO, 88/05053, A (ASAHI KASEI KOGYO KK) 14. 7月. 1988 (14. 07. 88) & JP, 1-6219, A & EP, 312598, A	10, 11, 15, 16, 19, 21
A	WO, 91/02002, A (UNIV WASHINGTON) 11. 3月. 1991 (11. 03. 91) & EP, 483247, A & US, 5514787, A & JP, 5-501398, A	10-16, 19, 21
X	EP, 253455, A (GIST-BROCADES N. V) 20. 1月. 1988 (20. 01. 88) & JP, 63-313587, A	1-7, 10-12, 19, 21
A	Biochemistry, 26, 1987, Wen Duanzhi et al. 「Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene」 p. 4350-4357	10-16, 19, 21
A	Nippon Yakurigaku Zasshi, 88, 1986, Nakayama K. et al. 「Effects of urinastatin on energy metabolism disorder during shock」 p. 195-203	10-16, 19, 21
A	EP, 383599, A (MERCK & CO INC) 22. 8月. 1990 (22. 08. 90) & JP, 7-278200, A & WO, 90/00758, A	1-21
A	WO, 88/09343, A (CENTRAL GRASS CO LTD) 1. 12月. 1988 (01. 12. 88) & US, 5095096, A & EP, 317641, A & JP, 63-504508, A	1-21
A	JP, 7-509227, A (UNIV OREGON HEALTH SCI) 12. 10月. 1995 (12. 10. 95) & US, 5256641, A & EP, 650371, A & WO, 94/01138, A	1-21



• • • •

THIS PAGE BLANK (USPTO)